

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 8 月 16 日 (16.08.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/58459 A1

(51) 国際特許分類: A61K 31/737, 38/17,
39/395, 45/00, A61P 31/20, C07K 16/10, C12N 15/09,
G01N 33/50, 33/53, 33/576

山田東4丁目35番1-1314 Osaka (JP). 宮村達男 (MIYAMURA, Tatsuo) [JP/JP]; 〒168-0065 東京都杉並区浜田山4-21-22-113 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/00967

(74) 代理人: 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.);
〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目5番5号 KRFビル
5階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2001 年 2 月 13 日 (13.02.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-34906 2000 年 2 月 14 日 (14.02.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三菱東京製薬株式会社 (MITSUBISHI TOKYO PHARMACEUTICALS, INC.) [JP/JP]; 〒103-8405 東京都中央区日本橋本町二丁目2番6号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 伊丹清馬 (ITAMI, Seima) [JP/JP], 渋谷達郎 (SHIBUI, Tatsuro) [JP/JP], 関 誠 (SEKI, Makoto) [JP/JP], 四本能尚 (YOTSUMOTO, Yoshihisa) [JP/JP]; 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 三菱東京製薬株式会社 横浜研究所内 Kanagawa (JP). 松浦善治 (MATSUURA, Yoshiharu) [JP/JP]; 〒565-0821 大阪府吹田市

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDIES FOR HEPATITIS C

(54) 発明の名称: C型肝炎治療薬

(57) Abstract: A substance inhibiting the binding of hepatitis C virus E2/NS1 protein to cells with potential infection with hepatitis C virus, cells with the expression of CD81 or CD81. Thus, novel drugs having antiviral effects (inhibition of the infection with HCV, etc.) can be provided.

(57) 要約:

本発明によれば、C型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白と、C型肝炎ウィルスの感染性のある細胞、CD81 を発現する細胞または CD81 との結合を阻害する物質が提供される。本発明によると、HCV の感染阻止作用などの抗ウイルス効果を有する新規な医薬品が提供可能である。

WO 01/58459 A1

明細書

C型肝炎治療薬

技術分野

本発明は、C型肝炎ウイルス（以下「HCV」ということもある）のエンベロープ糖蛋白に結合する種々の物質に関し、詳細には HCV のエンベロープ糖蛋白と結合することにより HCV の感染阻止作用などの抗ウイルス効果を有する、抗体などの蛋白質、硫酸化多糖類、低分子化合物に存する。

背景技術

1989 年米国カイロン社によって、従来非 A 非 B 型肝炎ウイルスと呼ばれていたヒト肝炎ウイルスの遺伝子断片がクローニングされ、HCV と命名された (SCIENCE, Vol.244, 359-362, 1989)。HCV は一本鎖+鎖 RNA をゲノムとするウイルスである。その後カイロン社の他、国立癌センターの下遠野ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.87, 9524-9528, 1990)、大阪大・微研の高見沢ら (J. Virol, Vol.65, No.3, 1105-1113, 1990) によって、C型肝炎ウイルスの全遺伝子の配列が発表されている。その後 HCV にはコア、エンベロープ 1（以下「E1」または「E1 蛋白」ということもある）、エンベロープ 2（以下「E2/NS1」または「E2/NS1 蛋白」ということもある）の 3 種類の構造蛋白質と 6 種類の非構造蛋白質が存在することが分かった。

HCV が発症すると高い確率で急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変を発症させ、最終的には肝臓へと移行し患者を死亡させる。従来は治療には抗ウイルス薬であるインターフェロンが代表的に使われているが、治療効果は患者ごとにばらつきがある点、発熱等の副作用がある点が問題となっている (J. Med. Virol., Vol.42, 299-305, 1994) (日消会誌, Vol.91, 995-1002, 1994)。

またリバビリン等、他の抗ウイルス薬による治療も検討されているがこれも十分な効果は得られておらず (Lancet, Vol.337, 1058-1061, 1991)、新たな抗 HCV

薬の開発が待たれているのが現状であった。

一方、HCV の遺伝子は非常に変異がしやすいと考えられていて、HCV はその高変異性ゆえに患者の体内の免疫から逃れているものと考えられていた。特に HCV の E2/NS1 の N 末端には 25 個から 30 個のアミノ酸からなる hyper variable region (超可変領域) と呼ばれる変異に富む領域があるとされており、ヒトの免疫系のエピトープは hyper variable region などではないかと加藤らにより予測されている (J. Virol., Vol.67, No.7, 3923-3930, 1993) (J. Virol., Vol.68, No.8, 4776-4784, 1994)。すなわち、ヒトの免疫系、例えば中和抗体の認識する領域は hyper variable region 内にあるので中和抗体が感染患者生体内でできて hyper variable region がすぐに変異してウィルスが抗体からエスケープしてしまうのではないかと考えられている。しかし、石井らの報告で E2/NS1 とヒト T 細胞 Molt-4 の結合を阻害する抗体が、HCV から自然治癒した患者の血中にのみ高活性で見られ、HCV の高変異性にも関わらず HCV の治癒に液性免疫が関与していることが示唆された (Hepatology, Vol.28, No.4, 1117-1120, 1998)。

ところで、1999 年米国カイロン社により E2/NS1 が結合する細胞表面の蛋白として CD81 が単離された (SCIENCE, Vol.282, 938-941, 1999)。大腸菌で発現した CD81 と E2/NS1 は石井らの報告と同様に結合し、また HCV 自然治癒患者の血清はこの結合を阻害した。この結果より CD81 は HCV のレセプターであることが示唆された。

以上より HCV の細胞への感染に深く関与していると思われるエンベロープ蛋白に結合し、かつ、HCV の感染性のあるヒト細胞への結合を阻止する、例えば、抗体のような物質を薬剤として利用すると、血中の HCV が新たに肝臓等の感染対象臓器に感染することを阻止することが可能となり、HCV 患者を治癒へと導くことが可能であると考えられた。しかしながら、HCV に起因する疾患に対する感染阻止物質については、まだ十分な検討が行われていなかったのが現状であった。

発明の開示

HCV は RNA ウィルスであるため非常に変異しやすいことが知られている。この変異により HCV の構造蛋白、非構造蛋白ともに様々な箇所が変異をする。この変異のため HCV の感染を阻止する物質、例えばある特定の蛋白配列を認識する抗体等を開発することは困難であると考えられていた。しかし、本願発明者らは、石井らの報告にある中和抗体は、治癒患者ごとに感染しているウィルスの配列が異なるにもかかわらず、ただ一種類の E2/NS1 への結合を阻止しているという点に着目した。すなわち、抗原の特定の領域あるいは構造を認識する物質ならば、ウィルスの配列の多様性にも関わらず、E2/NS1 と HCV の感染性のあるヒト細胞、CD81 発現細胞または CD81 との結合を阻止し、感染阻止が可能であると考えた。

本発明では、C 型肝炎患者の症状を改善する薬剤開発のため、E2/NS1 と HCV 感染性のある細胞、CD81 発現細胞または CD81 の結合を阻害する物質の探索を重ねた結果、HCV の HCV 感染性細胞への結合および感染阻止が期待される物質を取得するに至った。

即ち、本発明によれば、C 型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白と、C 型肝炎ウィルスの感染性のある細胞、CD81 を発現する細胞または CD81 との結合を阻害する物質が提供される。

本発明の好ましい態様によれば、C 型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白のプラスチャージを有する領域に結合することにより、C 型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白と、C 型肝炎ウィルスの感染性のある細胞、CD81 を発現する細胞または CD81 との結合を阻害することを特徴とする物質；C 型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白が、C 型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白に該 E2/NS1 蛋白を認識可能な物質をつけた蛋白であることを特徴とする物質；C 型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白が、C 型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白に蛍光法または発色法により該 E2/NS1 蛋白を検出可能な物質をつけた蛋白であることを特徴とする物質；C 型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白が、C 型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白にタグをつけた蛋白であることを特徴とする物質；C 型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白が、C 型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白の C 末端にタグをつけた蛋白であることを特徴とする物質；CD81 を発現する細胞が、ヒト CD81

を発現する細胞であることを特徴とする物質；CD81 が、可溶化発現したヒト CD81 であることを特徴とする物質；C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白との結合定数が 10^8 以上であるか解離定数が 10^{-8} 以下であることを特徴とする物質；結合定数が 10^9 以上であるか、または、解離定数が 10^{-9} 以下であることを特徴とする物質；物質が、蛋白質、硫酸化多糖類または低分子化合物であることを特徴とする物質；蛋白質が、抗体であることを特徴とする物質；抗体が、C型肝炎治癒患者の B 細胞由来であることを特徴とする物質；抗体が、C型肝炎治癒患者の B 細胞の遺伝子由来であることを特徴とする物質；並びに、C型肝炎治癒患者が自然治癒患者であり、B細胞が末梢血単核球細胞であることを特徴とする物質が提供される。

本発明の別の側面によれば、

H 鎖の可変領域の CDR-1、CDR-2 及び CDR-3 がそれぞれ配列表の配列番号：1、2 及び 3 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：1、2 及び 3 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体；

配列表の配列番号：16 又は 34 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：16 又は 34 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする上記抗体；

L 鎖の可変領域の CDR-1、CDR-2 及び CDR-3 がそれぞれ配列表の配列番号：4、5 及び 6 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：4、5 及び 6 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体；

配列表の配列番号：17 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：17 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする上記抗体；

L 鎖の可変領域の CDR-1、CDR-2 及び CDR-3 がそれぞれ配列表の配列番号：7、8 及び 9 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：7、8 及び 9 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたア

ミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体；

配列表の配列番号：18 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：18 に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする上記抗体；

L鎖の可変領域の CDR-1、CDR-2 及び CDR-3 がそれぞれ配列表の配列番号：10、11 及び 12 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：10、11 及び 12 に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体；

配列表の配列番号：19 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：19 に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする抗体；

L鎖の可変領域の CDR-1、CDR-2 及び CDR-3 がそれぞれ配列表の配列番号：13、14 および 15 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：13、14 及び 15 に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体；

配列表の配列番号：20 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：20 に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする上記抗体；

が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、L鎖の可変領域の CDR-1、CDR-2 及び CDR-3 がそれぞれ配列表の配列番号：42、43 及び 44 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：42、43 及び 44 に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体；

配列表の配列番号：54 に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：54 に記

載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする上記抗体；

L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号：45、46及び47に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：45、46及び47に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体；

配列表の配列番号：55に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：55に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする上記抗体；

L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号：48、49及び50に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：48、49及び50に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体；

配列表の配列番号：56に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：56に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする上記抗体；

L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号：51、52および53に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：51、52及び53に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体；

配列表の配列番号：57に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：57に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする上記抗体；
が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、重鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号：40に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：40に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体；

軽鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号：41に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：41に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体；

が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列表の配列番号：26、27、28又は29に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：26、27、28又は29に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する一本鎖抗体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列表の配列番号：36、37、38又は39に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：36、37、38又は39に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する一本鎖抗体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、配列表の配列番号：62、63、64又は65に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：62、63、64又は65に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する一本鎖抗体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の抗体をコードする核酸が提供される。好ましくは、配列表の配列番号：21、22、23、24、25、35、58、59、60、61のいずれかに記載の塩基配列を含有する、上記核

酸；配列表の配列番号：40又は41に記載の塩基配列を含有する上記核酸；配列表の配列番号：26、27、28、29のいずれかに記載の塩基配列を含有する上記核酸；配列表の配列番号：36、37、38、39のいずれかに記載の塩基配列を含有する上記核酸；配列表の配列番号：62、63、64、65のいずれかに記載の塩基配列を含有する上記核酸が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記したいずれかの核酸を用いた抗体の生産方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記方法によって得ることができ、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する組換え抗体が提供される。好ましくは、抗体のFc領域がヒト型である組換え抗体、抗体が1本鎖抗体である組換え抗体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の物質を有効成分として含有する医薬、上記した本発明の抗体を有効成分として含有する医薬、上記した本発明の組換え抗体を有効成分として含有する医薬が提供される。好ましくは、C型肝炎の治療および/または予防のための医薬、及びC型肝炎の診断のための医薬が提供される。また、本発明によれば、上記した本発明の物質を有効成分として含有する抗HCV剤、上記した本発明の抗体を有効成分として含有する抗HCV剤、上記した本発明の組換え抗体を有効成分として含有する抗HCV剤が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、C型肝炎治癒患者のB細胞を刺激し、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対する抗体のmRNAを発現させた上で、該B細胞から抗体mRNAおよび抗体cDNAを取得し、該E2/NS1に結合する抗体の可変領域の配列を取得する方法が提供され、好ましくは、C型肝炎治癒患者が自然治癒患者であり、B細胞が末梢血単核球細胞であることを特徴とする、抗体の可変領域の配列を取得する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記方法で取得された可変領域の配列を有する抗体が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、被験物質の存在下及び非存在下において、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と、C型肝炎ウイルスの感染性のある細胞、CD81 を発現する細胞または CD81 とを接触させる工程;並びに被験物質の存在下及び非存在下における C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と、C型肝炎ウイルスの感染性のある細胞、CD81 を発現する細胞または CD81 との結合を比較する工程を含む、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と、C型肝炎ウイルスの感染性のある細胞、CD81 を発現する細胞または CD81 との結合を阻害する物質のスクリーニング方法が提供される。好ましくは、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白が、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に該 E2/NS1 蛋白を認識可能な物質をつけた蛋白であることを特徴とするスクリーニング方法、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白が、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に蛍光法または発色法により該 E2/NS1 蛋白を検出可能な物質をつけた蛋白であることを特徴とするスクリーニング方法、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白が、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白にタグをつけた蛋白であることを特徴とするスクリーニング方法、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白が、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白の C末端にタグをつけた蛋白であることを特徴とするスクリーニング方法、CD81 を発現する細胞が、ヒト CD81 を発現する細胞であることを特徴とするスクリーニング方法、CD81 が、可溶化発現したヒト CD81 であることを特徴とするスクリーニング方法、被験物質が、蛋白質、硫酸化多糖類または低分子化合物であることを特徴とするスクリーニング方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記したいずれかのスクリーニング方法により得られる、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と、C型肝炎ウイルスの感染性のある細胞、CD81 を発現する細胞または CD81 との結合を阻害する物質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、被験物質の存在下及び非存在下において、HCV に感染性のある細胞と HCV 蛋白を発現している細胞との結合を測定し、被験物質の非存在下での結合と比較する工程を含むスクリーニング方法で得られる C型肝炎ウイルスの生活環を阻害する物質、及び被験物質の存在下及び非存在下に

において、HCV に感染性のある細胞と HCV 蛋白を発現している細胞とが結合した後に、被験物質と HCV に感染性のある細胞又は HCV 蛋白を発現している細胞との融合を測定し、被験物質の非存在下での融合と比較する工程を含むスクリーニング方法で得られる C 型肝炎ウイルスの生活環を阻害する物質が提供される。好ましくは、被験物質は蛋白質、硫酸化多糖類または低分子化合物である。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した物質を有効成分として含む、抗 HCV 剤；上記した物質を用いて、抗 HCV 剤を製剤化することを含む抗 HCV 剤の製造方法が提供され、該製造方法は、好ましくは、上記スクリーニング方法を用いて C 型肝炎ウイルスの増殖を阻害することを確認する工程を含む。

図面の簡単な説明

- 図 1 は、本発明の抗体 scFv1-1、及び scFv1-4 の中和活性を示す図である。
- 図 2 は、ヘパリンの中和活性を示す図である。
- 図 3 は、スラミンの中和活性を示す図である。
- 図 4 は、改変 s c F v の N O B 活性を示す図である。
- 図 5 は、w h o l e 抗体の N O B 活性を示す図である。
- 図 6 は、w h o l e 抗体の c e l l f u s i o n 阻害活性を示す図である。
- 図 7 は、発現プラスミド pEX gamma1 loxP-Hyg HCVI の構築を示す図である。
- 図 8 は、発現プラスミド pEX kappa Km HCVI の構築を示す図である。
- 図 9 は、発現プラスミド pEX loxp-Hyg HCV1 W の構築を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明に関して詳細に説明する。

本発明の物質は、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と、C 型肝炎ウイルスの感染性のある細胞（以下「HCV 感染性細胞」ということもある）、CD81 を発現する細胞（以下「CD81 発現細胞」ということもある）または CD81 との結合を阻害する物質である。

上述のような物質を選び出し、それぞれの物質が E2/NS1 と、HCV 感染性細胞、CD81 発現細胞または CD81 との結合を阻害することが可能であるかを以下に示す。

前述のとおり HCV のエンベロープ蛋白には E1 と E2/NS1 がある。そのうち E2/NS1 の hyper variable region と呼ばれる変異に富む領域がヒトの免疫系のエピトープではないかと予測されている。すなわち、ウィルスの感染の第一段階である細胞との結合には E2/NS1 が深く関与していることが予想されるので、本発明では E2/NS1 と HCV 感染性細胞、CD81 発現細胞または CD81 との結合を阻止する物質を HCV の細胞への結合または感染阻止物質として開発に至った。

E2/NS1 は HCV のゲノムから発現される蛋白の 384 番目のアミノ酸から 746 番目のアミノ酸までである。本発明においては、E2/NS1 の HCV 感染細胞への結合は、例えば、HCV 遺伝子の E2/NS1 の C 末端にタグをつけた蛋白を可溶化した形で発現させ、HCV 感染性細胞または CD81 発現細胞に結合させ、そのタグに対する抗体を使い、発光法または発色法にて E2/NS1 の上記細胞への結合を確認した。結合を阻害する物質は、結合を確認する系にて可溶化 E2/NS1 と前述の細胞を結合させる前に E2/NS1 と結合阻害を確認したい物質を混合し、その後該細胞を混合して発光または発色の変化を測定することにより確認した。結合を阻害する物質は、詳しくは後述するが、例えば H 鎖に配列番号 1 から 3 に記載のアミノ酸配列があり、L 鎖に配列番号 4 から 6 に記載のアミノ酸配列がある抗体、ヘパリン、suramin 等が挙げられるが、E2/NS1 と HCV 感染性細胞または CD81 発現細胞との結合を阻害する物質であればこれに限らない。また、可溶化 CD81 と E2 が結合することも報告されている (SCIENCE, Vol.282, 938-941) ので、上記物質を用いても可溶化 CD81 と E2 の結合を阻害することが可能であることは容易に類推される。

ここでヘパリン等の硫酸化多糖類はマイナスチャージが強いことが知られており、アンチトロンビン III や繊維芽細胞成長因子などの蛋白におけるプラスチャージが強い領域に結合することが知られている (FEBS Lett, Vol.69, 51-54, 1976) (Cell, Vol.64, 841-848, 1991)。また、後述の実施例に示すとおり、本発明において、E2/NS1 はヘパリンに結合することが発見された。すなわち、実施例に示

した物質のうち、ヘパリンは E2/NS1 のプラスチャージの強い場所に結合することにより、E2/NS1 と、HCV 感染性細胞、CD81 発現細胞または CD81 の結合をすることを阻害しているものと容易に類推できる。すなわち、E2/NS1 のプラスチャージを有する領域に結合する物質であれば、E2/NS1 と HCV 感染性細胞、CD81 発現細胞または CD81 との結合を阻害することが可能である。

また、ヘパリン等の硫酸化多糖類が糖蛋白質に結合した際にその蛋白の表面のチャージに影響を与え、構造的な変化を与えることもあるので本発明で硫酸化多糖類と E2/NS1 の結合を確認したが、E2/NS1 と、HCV 感染性細胞、CD81 発現細胞または CD81 の結合へ上記の様な構造変化が関与していることも想像される。

ここでいうマイナスチャージとプラスチャージとは、蛋白あるいはそれに結合している糖鎖上に存在する荷電のある箇所である。本発明では E2/NS1 が Heparin sepharose CL-6B (ファルマシア社) に結合し、0.15M の NaCl を含む 10mM リン酸バッファーにより溶出されない時にカラムと結合しているドメインとする。

本発明において、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白を認識可能な物質とは、以下で述べるようなタグをつけた蛋白や、ハプテン等の抗体により該 E2/NS1 蛋白を検出可能な物質を意味する。

本発明でいう C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白にタグをつけた蛋白とは、例えば HCV ゲノム上の 384 番目から 711 番目までのアミノ酸からなる蛋白質の C 末端に、それ自体公知である E tag (ファルマシア社)、Histag、myctag、FLAGtag、HA tag、GST、IgG Fc 領域等の 5 個以上のアミノ酸からなる、特異的抗体に認識されうる配列を付加したものであれば特に限定されない。さらに言えば、先に論じたとおり HCV の E2/NS1 の N 末端には hyper variable region という免疫系のエピトープが存在すると考えられている。ゆえに、E2/NS1 にタグを結合させて発現させる場合、C 末端にタグを結合させたものを使用することが望ましい。またこのようにして得られた蛋白は、可溶性である。この可溶性の E2/NS1 は 384 番目のアミノ酸から 746 番目のアミノ酸までの間の E2/NS1 の膜外ドメインを発現させたものであれば特に制限なく使用可能である。タグのついた可溶化蛋白 E2/NS1 は、動物細胞、

昆虫細胞、酵母等蛋白に糖鎖を付加することが可能な細胞に発現させることができる。

さらに、C型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白にハプテン等の抗体等により検出可能な物質をつけた蛋白とは、例えば、E2/NS1 は 384 番目のアミノ酸から 746 番目のアミノ酸までの間の E2/NS1 の膜外ドメインを発現させたものに、ビオチン、フルオレセイン、DIG 等の抗体等に認識されうる低分子を結合させた物質を言う。ここで、低分子を認識する物質は、例えば、例示したビオチンの場合は抗体以外にもアビジン、ストレプトアビジン等の蛋白にも認識されうるので、その物質を認識するものであれば特に抗体および蛋白質である必要はない。

さらに、C型肝炎ウィルスの E2/NS1 蛋白に蛍光法、発色法により検出可能な物質をつけた蛋白とは、例えば、E2/NS1 は 384 番目のアミノ酸から 746 番目のアミノ酸までの間の E2/NS1 の膜外ドメインを発現させたものに FITC、アルカリフォスファターゼ、HRP 等の蛍光を発するか、その物質とある物質、例えば酵素の基質を混合した際に発色をする物質を結合させた物質を言うが、特にそれらに限定されるわけではない。

本発明でいう HCV の感染性のある細胞とは、HCV が増殖または感染されうる細胞として Huh7、HepG2、WRL68 等のヒト肝細胞や、Molt-4、MT-2、Daudi 等のリンパ球系の細胞をいうが、HCV の感染性が認められる細胞であればここに記載した細胞でなくともよい。

CD81 を発現する細胞とは一例を示すと、ヒトの CD81 遺伝子 (Gen Bank 登録番号 M33680) をインビトロゲン社の pCDNA3.1(+) のマルチクローニングサイトに挿入したベクターを NIH3T3 細胞にリポフェクチン (GIBCO BRL) を用いて導入したものが挙げられるが、遺伝子組換えの定法にて構築された細胞にてヒト CD81 の発現がウェスタンブロッティング、抗 CD81 抗体による蛍光検出法、ノザンブロッティング等の蛋白あるいは mRNA を検出可能な方法で確認される限り、本発明においては、CD81 発現用のベクター、発現細胞、遺伝子導入法は特に限定されない。

本発明において、E2/NS1 と CD81 との結合を阻害する物質を選択する場合、こ

ここで述べる CD81 は可溶化ヒト CD81 も利用できる。可溶化ヒト CD81 は、CD81 の膜外ドメインを発現させたものであれば特に制限なく使用可能である。可溶化 CD81 は、動物細胞、昆虫細胞、酵母および大腸菌等を用いて遺伝子組換えの定法を用いて発現させることが可能である。さらに可溶化 CD81 は膜外ドメインのみを発現させたものである必要もなく、例えば精製や検出の目的のためにタグを付けたものや修飾したものであっても問題ない。

なお、タグに対する抗体を使った E2/NS1 と HCV 感染性細胞または CD81 発現細胞または CD81 の結合の検出法で挙げた発光法、発色法は、好ましくはフローサイトメトリー、cell ELISA 法、ELISA 法等が挙げられる。ただし、E2/NS1 と CD81 発現細胞または CD81 の結合を検出することが可能な方法であれば特に限定されない。

本発明という抗体とは、通常生体内に存在する形の抗体の他に、抗体の H 鎖もしくは L 鎖の可変領域もしくはその組み合わせで形成される抗原結合部位を少なくとも 1 つ含むペプチド、1 組の H 鎖断片と L 鎖断片からなる Fab、2 組の H 鎖断片と L 鎖断片からなる F(ab')₂、H 鎖断片と L 鎖断片が同一ペプチドに直列に結合した一本鎖抗体（以下「scFv」ということもある）なども含まれる。本発明では、whole 抗体が最も好ましい。

本発明においては、モノクローナル抗体の作製は、C 型肝炎治癒患者の B 細胞より抗体の遺伝子を取得することにより行った。ヒト由来の複数の B 細胞より目的とする抗体の遺伝子のみを単離する方法として、EBV を患者の B 細胞に transform して B 細胞を不死化してから目的の抗体を生産する細胞のみクローニングする等の手法が従来あるが、本発明者は鋭意検討の結果ファージディスプレイ法により scFv を取得するに至った。

ファージディスプレイ法による抗体の取得の一例を挙げれば、C 型肝炎治癒患者からヘパリン採血を行い、Ficoll 法にて末梢血単核球を取得し、抗 CD19 抗体単体を利用して B 細胞のみを精製した。この後、ヒト IL-2、ヒト IL-10、E2/NS1 抗原 1ng/ml、抗ヒト CD40 抗体 1μg/ml を用いて B 細胞に抗体遺伝子の mRNA への

転写を刺激した。この B 細胞の精製は、B 細胞を特異的に分離できるものであれば特に制限されない。また、B 細胞の刺激についても、前述以外の方法を用いてもよいし、適宜省略した方法を用いても問題ない。その後、B 細胞より抗体 mRNA、さらに抗体 cDNA を取得した。さらに、scFv 発現プラスミドに H 鎖と L 鎖可変領域の遺伝子を組み込める一本鎖抗体の遺伝子の枠組みを作製し、さらにその下流に M13 ファージの gene3 遺伝子を結合した。その H 鎖および L 鎖の可変領域を組み込む場所に上記取得 cDNA から PCR 法にてランダムに取得した H 鎖および L 鎖を組み込んだ。このプラスミドを用いて M13 ファージの先端に gene3 蛋白と融合蛋白の形で組み込んだ一本鎖抗体を発現させ、そのうち E2/NS1 に結合するもののみ選択することにより、H 鎖の可変領域の CDR1、CDR2、CDR3 がそれぞれ配列表の配列番号 1,2 および 3 に記載のアミノ酸配列であり、L 鎖の可変領域の CDR1、CDR2、CDR3 がそれぞれ配列表の配列番号 4,5 および 6 に記載のアミノ酸配列である一本鎖抗体 scFv1-1 及び該 scFv1-1 を発現するファージを取得した。そして、scFv1-1 及び該 scFv1-1 を発現するファージが、特に E2/NS1 に対して親和性が強く、E2/NS1 と HCV 感染性細胞、CD81 発現細胞または CD81 の結合を強く阻害することを見いだした。

なお、上記では、M13 ファージのシステムを用いて一本鎖抗体をスクリーニングする手法を挙げたが、本発明においては、「抗体」とファージの表面に提示される蛋白が、融合蛋白の形で発現させる手法であれば特に制限されない。

本発明でいう C 型肝炎治癒患者とは、血液中に HCV の mRNA が検出され肝機能を測定する値、例えば ALT 等の値に異常が見られる、いわゆる C 型肝炎の状態であった患者の血液中の HCV の mRNA が検出限界以下になり、ALT 等の肝機能測定値が正常化した状態が 6 ヶ月以上続いた状態の患者のことを指す。

上記で本発明の抗体の代表例として例示した scFv1-1 は、BIACORE (BIACORE 社) を用いて E2/NS1 との結合定数 K_a を測定すると 4.5×10^8 (M)、解離定数 K_d は 2.2×10^{-9} (1/M) であった。また、本発明者らは、scFv1-1 と同じ可変領域の H 鎖を持ち L 鎖の可変領域が異なる一本鎖抗体も複数取得しそれぞれの一本鎖抗体の結合

能力と E2/NS1 と HCV 感染性細胞ならびにヒト CD81 発現細胞との結合を阻害する能力を比較したところ、それぞれの結合能力と E2/NS1 と細胞の結合阻止能力には相関が見られた。その中で結合定数が 10^8 (M)以上、解離定数が 10^{-8} (1/M)以下である一本鎖抗体 scFv1-1 が、その阻害活性から鑑みるに医薬品としての能力が十分であると判断できる。すなわち、E2/NS1 への結合定数が BIACORE で測定して 10^8 (M)以上、解離定数が 10^{-8} (1/M)以下である抗体が、HCV 感染性細胞へ感染することを阻止する医薬品としてはより好ましい。抗体の能力をさらに上げるためには、結合定数が 10^9 (M)以上、解離定数が 10^{-9} (1/M)以下の抗体がさらに好ましいものとして挙げられる。

通常の抗体は大小二種類のポリペプチドからなり、大きい方のサブユニットを「H鎖」、小さい方のサブユニットを「L鎖」という。また、それぞれのペプチドは N 末端側に存在して抗原結合部位を形成する「可変領域」と抗体のクラス別に一定の「定常領域」からなっている。可変領域はさらに特に抗原結合部位の形成に密接に関与している相補性決定領域「CDR」とその間に存在する「フレームワーク」に分けられる。CDR には H 鎖と L 鎖のそれぞれについて N 末端側から「CDR1」、「CDR2」、「CDR3」と呼ばれる 3 つの領域があることが知られている。

以下、本発明の抗体 ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4 を例に挙げて説明する。抗体 ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4 のアミノ酸配列は配列表の配列番号 1 から 20 に記載され、DNA 配列は配列番号 21 から 25 に記載される。

抗体の可変領域を構成するアミノ酸は抗体により異なることが多い。ScFv1-1 の H 鎖の部分のアミノ酸配列は配列番号 16 に示した。ここで、配列番号：16 には、scFv を大腸菌に発現させるための配列、すなわち scFv1-1 の H 鎖の N 末端に 2 アミノ酸を付加した配列のものを示した。ゆえに抗体としてのフレームワークとして考えると配列番号 16 のアミノ酸の 3 位から 32 位はフレームワーク 1、33 位から 37 位までは「CDR1」、38 位から 51 位まではフレームワーク 2、52 位から 68 位までは「CDR2」、69 位から 100 位まではフレームワーク 3、101 位から 117

位までは「CDR3」、118位から128位まではフレームワーク4を示す。ScFv1-1のL鎖の部分のアミノ酸配列は配列番号17に示した。配列番号17のアミノ酸の1位から23位まではフレームワーク1、24位から34位までは「CDR1」、35位から49位まではフレームワーク2、50位から56位までは「CDR2」、57位から88位まではフレームワーク3、89位から97位までは「CDR3」、98位から111位まではフレームワーク4を示す。ScFv1-2および1-3および1-4のH鎖のアミノ酸配列はすべて配列番号16に示したものである。L鎖については、それぞれ下記の通りである。ScFv1-2のL鎖の部分のアミノ酸配列は配列番号18に示した。配列番号18のアミノ酸の1位から23位まではフレームワーク1、24位から34位までは「CDR1」、35位から49位まではフレームワーク2、50位から56位までは「CDR2」、57位から88位まではフレームワーク3、89位から97位までは「CDR3」、98位から111位まではフレームワーク4を示す。ScFv1-3のL鎖の部分のアミノ酸配列は配列番号19に示した。配列番号19のアミノ酸の1位から23位まではフレームワーク1、24位から34位までは「CDR1」、35位から49位まではフレームワーク2、50位から56位までは「CDR2」、57位から88位まではフレームワーク3、89位から97位までは「CDR3」、98位から111位まではフレームワーク4を示す。ScFv1-4のL鎖の部分のアミノ酸配列は配列番号20に示した。配列番号20のアミノ酸の1位から22位まではフレームワーク1、23位から36位までは「CDR1」、37位から51位まではフレームワーク2、52位から58位までは「CDR2」、59位から90位まではフレームワーク3、91位から102位までは「CDR3」、103位から116位まではフレームワーク4を示す。これらのフレームワークとCDRの境目はKabatらの「免疫学的に有利な蛋白の配列」(National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)および(1991))を参考にして決定された。

ScFvの調製にはRecombinant Phage Antibody System (ファルマシア社)などを利用することが可能であるが、生産宿主となる大腸菌にとって該一本鎖抗体が毒性を持ち、大腸菌の死滅、該一本鎖抗体の分解を起こすような場合には、キットを有効に利用できず多くの工夫を要する。一本鎖抗体は、pSE380 プラスミド(イ

ンビトロジェン社) や pET24d(+)プラスミド (ノバジェン社) などの誘導性のベクターと宿主となる菌体を検討することにより調製しうる。また、生産においては、上述の方法の他、動物細胞発現系、昆虫細胞発現系、酵母細胞発現系も有効に利用しうる。H 鎖および L 鎖を結合するリンカーは実施例では (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) ×3 回繰り返しの 15 残基のアミノ酸を利用したが、本発明においては、本配列に限定されずに利用することが可能である。

配列表の配列番号 21 には、配列表の配列番号 16 のアミノ酸の 1 位から 128 位に相当する核酸の塩基配列を示した。配列表の配列番号 22 には、配列表の配列番号 17 のアミノ酸の 1 位から 111 位に相当する核酸の塩基配列を示した。配列表の配列番号 23 には、配列表の配列番号 18 のアミノ酸の 1 位から 111 位に相当する核酸の塩基配列を示した。配列表の配列番号 24 には、配列表の配列番号 19 のアミノ酸の 1 位から 111 位に相当する核酸の塩基配列を示した。配列表の配列番号 25 には、配列表の配列番号 20 のアミノ酸の 1 位から 116 位に相当する核酸の塩基配列を示した。なお、これらの塩基配列においても、本願で述べているような効果を呈する限り、1 もしくは数個の塩基が欠失、置換もしくは付加された塩基配列を含むものも本発明の範囲に含まれる。

抗体の抗原特異性と抗原への結合の強さが、主に CDR のアミノ酸配列によって決定されることはマウスの抗体のヒト化で示されている (Methods in Enzymology, 203, 99-121, 1991)。

さらに、scFv から通常生体内にある形の抗体を作製することが可能である。一例を挙げると、E2/NS1 に結合する scFv のプラスミドから H 鎖および L 鎖の可変領域部分のみを PCR 法にて増幅する。それぞれの断片は、例えば、ヒトの抗体の H 鎖遺伝子及び/または L 鎖遺伝子を有するプラスミドに組み換えて、上記 scFv 上にある可変領域を持つ通常生体内にある形の抗体にすることが可能である。具体的には、例えば、プラスミドから H 鎖および L 鎖の可変領域を増幅するとき得られる遺伝子断片の両端に、適当な制限酵素切断部位を入れておいて、ヒト抗体の H 鎖及び/または L 鎖を有するプラスミド上の適当な制限酵素切断部位と組み合

わせて、フレームシフトが起こらないように可変領域の遺伝子を入れ替える。このような方法によりプラスミド上にあった可変領域の配列をそのまま持つ通常生体内にある形の抗体を作ることとは可能である。この抗体からさらに、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域もしくはその組み合わせで形成される抗原結合部位を少なくとも1つ含むペプチド、1組のH鎖断片とL鎖断片からなるFab、2組のH鎖断片とL鎖断片からなる(Fab' 2)を作ることとも可能である。

さらに、本発明に示したH鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：1、2および3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：4、5および6に記載のアミノ酸配列である抗体、またはH鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：1、2および3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号：7、8および9に記載のアミノ酸配列である抗体、またはH鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：1、2および3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表配列番号：10、11および12に記載のアミノ酸配列である抗体、またはH鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号：1、2および3に記載のアミノ酸配列であり、L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2、およびCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号：13、14および15に記載のアミノ酸配列である抗体の配列を置換することによりE2/NS1への結合能力ならびに中和活性を高めることは可能である。例えば、CDR3の配列をランダムに置換して抗体を取り直すことも可能であり、H鎖およびL鎖のCDR1、CDR2、CDR3のアミノ酸配列および遺伝子の配列を置換することにより高活性の抗体を取得することも可能である。この際、アミノ酸配列を変換した抗体については、中和活性を失わない限り問題ない。すなわち、本発明においては、E2/NS1と、HCV感染性細胞、CD81発現細胞またはCD81との結合を阻害する能力を有する限り、上記アミノ酸配列において、置換、欠失、挿入等の修飾を加えたものについても、本発明の範囲に含まれ

る。

また、本発明の抗体 ScFv2-1、ScFv2-2、ScFv2-3、及び ScFv2-4 は、上記した抗体 ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4 の H 鎖中にアミノ酸置換を有する抗体である。抗体 ScFv2-1、ScFv2-2、ScFv2-3、及び ScFv2-4 の H 鎖のアミノ酸配列と DNA 配列を配列表の配列番号 34 及び 35 に記載する。

さらに、本発明の抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 のアミノ酸配列及び DNA 配列を配列表の配列番号 42 から 65 に記載する。

抗体 ScFv2-1、ScFv2-2、ScFv2-3、ScFv2-4、ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 についての説明は、抗体 ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4 の説明と同様である。

なお、本発明では全長抗体を使用することが好ましい。

本発明でいう抗体の発現には、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等を用いることができるが、人に医薬品として投与することを考えた場合、糖鎖修飾のされ方がよりヒト型に近い動物細胞を用いるのが好ましい。一例を挙げると、COS 細胞や CHO 細胞にて抗体を発現させるときには pCDNA3.1(+) や pMAMneo (CLONETECH 社) 等を使用することが可能である。例えば、上記の手法で取得した抗体の H 鎖の遺伝子を pCDNA3.1(+) のマルチクローニングサイトに、L 鎖の遺伝子を pMAMneo にそれぞれ組み込む。その上で H 鎖の組み込まれたベクターの適当なサイトにプロモーターと polyA の間に L 鎖の遺伝子がある発現ユニットを組み込む。このベクターを COS 細胞や CHO-K1、または CHO DG44 に遺伝子工学の定法にて導入することにより目的の抗体の生産が行える。さらに、上記作製したベクターに例えば pSV2/DHFR(Nature, 1981. Vol. 294, Lee F. et al.,) から DHFR 遺伝子の発現ユニットを切り出し、H 鎖と L 鎖を発現するベクターに組み込む。このベクターを CHO DG44 に遺伝子工学の定法にて遺伝子導入する。これにより選択した細胞は MTX を用いた DHFR 遺伝子増幅系を使用することにより抗体の生産性を大幅に上昇させることが可能である。COS 細胞では一過性の抗体の発現のみしか行えないが、CHO 細胞では抗体の遺伝子が染色体の組み込まれた形で発現することが可能である。

また、先に論じた DHFR 遺伝子増幅系を用いることにより抗体を高発現させることも可能であり、無血清培地で抗体生産を行うことができるので工業生産は CHO 細胞を用いるのがより好ましい。

COS 細胞は、通常 10%ウシ胎児血清(FBS)を加えた Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium(DMEM)を用い、5%CO₂存在下 37°Cで培養する。COS 細胞への遺伝子導入後の細胞の育種生産法は、「バイオマニュアルシリーズ 4 遺伝子導入と発現・解析法;横田崇、新井賢一」(羊土社、1994)等の実験書に記載されている。COS 細胞への遺伝子導入法は電気穿孔法その他、DEAE デキストラン法、lipofectin 等のトランスフェクション試薬を用いた方法であってもよい。

CHO K-1 細胞、CHO-DG44 細胞は、DMEM に 10% FBS を加えた培地の他、例えば CHO S SFM2(GIBCO 社)等の市販されている無血清培地を用いて 5%CO₂存在下 37°Cで培養することも可能である。CHO 細胞への遺伝子導入も COS 細胞と同様に電気穿孔法その他、DEAE デキストラン法、lipofectin 等のトランスフェクション試薬を用いた方法を用いることが可能である。特に CHO DG44 ではヒポキサンチン、チミジンのない培地で培養し、DHFR の阻害剤である MTX を培地に加えることにより遺伝子増幅による抗体の生産性の上昇が可能である。

本発明での抗体の生産時には、血清由来のウシ抗体の混入を避けるために、無血清の培地にて培養することが望ましい。無血清培地に馴化していない COS および CHO の血清培地で培養している細胞については、血清を入れていない DMEM によって培養することが望ましい。こうして培養上清中に得られた本発明の抗体は、例えばプロテイン A カラムやプロテイン G カラムを用いる一般的な IgG 抗体の精製法によって容易に精製することが可能である。

本発明で生産した抗体は HCV の治療に利用可能である。抗体の形状としては、生産抗体分子をそのまま利用することも可能であるが、各種プロテアーゼ処理により得られる抗原結合部位を含む断片である Fab、F(ab')₂、Fv、あるいは Fd なども適用することができるが、whole 抗体が最も好ましい。これらの断片については「抗体工学入門」(地人書館)に詳細な説明がなされている。断片ペプチドの

場合は抗体分子の酵素処理により得ることができるが、遺伝子工学的な手法により細菌、酵母などに生産させることも可能である。これらの方法により得たモノクローナル抗体、モノクローナル抗体由来抗体断片、ペプチド等を組み合わせることにより、より強固な結合性を生じる。

本発明で生産した抗体を利用し、HCV 感染患者の血液中の HCV 粒子を減少する。例えば、HCV の mRNA または、市販の HCV 診断薬により抗 HCV 抗体が血液中に観察される患者に本発明で生産した抗体を投与することにより血液中の HCV 粒子の量を減少させることにより HCV の再感染を防ぎ、HCV の治癒へと患者を導くことが可能である。さらに、本抗体は HCV 患者に投与されると HCV 患者の体内で HCV が感染している細胞のうち特に細胞表面に E2/NS1 が提示されている細胞にも結合しうる。この結合と生体内の補体等の免疫系の活性化により HCV の感染している細胞に対する障害能力をも期待できる。また、他の抗体由来の可変領域の遺伝子を組み合わせることにより、バイスベシフィック抗体、マルチスベシフィック抗体の生産も可能となる。マルチスベシフィック抗体とは、異なる抗原もしくは同じ抗原の異なるエピトープを認識する抗原結合部位を少なくとも 2 種類以上保有する抗体を言う。中でもバイスベシフィック抗体とは、異なる抗原もしくはエピトープを認識する抗原結合部位を 2 種類以上有する抗体を言う。例えば、通常の抗体の一方の抗原結合部位ともう一方の抗原結合部位が異なるバイスベシフィック抗体は通常の抗体よりも抗原と強くまた、幅広い配列の HCV と結合可能であると考えられる。さらに IgM としてより多価に抗原を認識する抗体の作成も可能である。こうした生産時にバイスベシフィック化する以外に、モノクローナル抗体を生産、精製し、その後に抗体同士を結合させバイスベシフィック化、マルチスベシフィック化することができる。このバイスベシフィック化は同一抗原のみでなく他の抗原に対する組み合わせも可能である。例えば、HCV 粒子に表出していると言われている E1 に対する抗体を利用してバイスベシフィック抗体、およびマルチスベシフィック抗体を作製することも可能である。

一本鎖抗体 ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4 のアミノ酸配列は配列

表の配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28 および配列番号 29 に示した。また、それをコードする核酸配列の例をアミノ酸配列とともに示した。配列番号 26 のアミノ酸配列の 1 位から 22 位は大腸菌からの分泌用シグナルを含む配列、23 位から 148 位は H 鎖の可変領域、149 位から 165 位はリンカー、166 位から 276 位は L 鎖の可変領域、277 位から 299 位は tag を含む配列を示す。配列番号 27 のアミノ酸配列の 1 位から 22 位は大腸菌からの分泌用シグナルを含む配列、23 位から 148 位は H 鎖の可変領域、149 位から 165 位はリンカー、166 位から 276 位は L 鎖の可変領域、277 位から 299 位は tag を含む配列を示す。配列番号 28 のアミノ酸配列の 1 位から 22 位は大腸菌からの分泌用シグナルを含む配列、23 位から 148 位は H 鎖の可変領域、149 位から 165 位はリンカー、166 位から 276 位は L 鎖の可変領域、277 位から 299 位は tag を含む配列を示す。配列番号 29 のアミノ酸配列の 1 位から 22 位は大腸菌からの分泌用シグナルを含む配列、23 位から 148 位は H 鎖の可変領域、149 位から 165 位はリンカー、166 位から 281 位は L 鎖の可変領域、282 位から 304 位は tag を含む配列を示す。

配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28 および配列番号 29 に記載のアミノ酸配列の 1 位から 22 位を欠失させ大腸菌菌体内に一本鎖抗体を発現することも可能である。また、配列番号 26、配列番号 27 および配列番号 28 に記載のアミノ酸の 277 位から 299 位までは一本鎖抗体の検出、ならびに精製のための配列であり、欠失あるいは如何なる配列にも置換しうる。また、配列番号 29 に記載のアミノ酸の 282 位から 304 位までも同様に一本鎖抗体の検出、ならびに精製のための配列であり、欠失あるいは如何なる配列にも置換しうる。大腸菌からの分泌シグナルおよび精製のための配列を含むベクターの作製は実施例に示したとおりである。配列番号 26、配列番号 27、配列番号 28 および配列番号 29 に記載のアミノ酸配列の 149 位から 165 位のリンカー配列は H 鎖および L 鎖の可変領域の立体構造を実質的に scFv1-1 と同様に保持できるものであれば如何なる配列にも置換しうる。一本鎖抗体は動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞の他大腸菌でも生産可能である。

また、一本鎖抗体 ScFv2-1、ScFv2-2、ScFv2-3、及び ScFv2-4 のアミノ酸配列

は配列表の配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38 および配列番号 39 に示し、それをコードする核酸配列の例をアミノ酸配列とともに示した。

さらに、一本鎖抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 のアミノ酸配列は配列表の配列番号 62、配列番号 63、配列番号 64 および配列番号 65 に示した。また、それをコードする核酸配列の例をアミノ酸配列とともに示した。

一本鎖抗体 ScFv2-1、ScFv2-2、ScFv2-3、ScFv2-4、ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 についての説明は、ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4 について上述した通りである。

一本鎖抗体でもバイスペシフィック化およびマルチスペシフィック化が可能である。例えば、1 ペプチド内に複数の抗原認識部位の組み合わせの H 鎖と L 鎖を繰り返して並べることにより生産させることができる。また、生産、精製後に連結することも可能である。H 鎖および L 鎖の組み合わせによらず、H 鎖のみもしくは L 鎖のみでも利用は可能である。こうした抗体種の選択は利用用途により行うことが可能であり、結合強度、抗原結合部位等により選択しうる。

さらに本発明は上記の抗体をはじめ、それと同様の機能を持ついわゆる本発明で規定した E2/NS1 と、HCV 感染性細胞、CD81 発現細胞または CD81 との結合を阻害する物質を有効成分として含有する医薬、例えば上記物質と薬学的に許容しうる担体とからなる医薬組成物を提供する。特に、本発明における抗 E2/NS1 抗体遺伝子は、効率的に抗 E2/NS1 抗体を生産することを可能とし、種々の形態の治療用製剤を提供する。こうして生産された組換え抗体は、例えば薬学的に許容しうる成分組成の担体や安定化剤などの人体への投与に際し、該抗体の活性を保持させるために使用される物質とともに医薬用組成物中に含まれていてもよい。このような担体や安定化剤としてはヒト血清アルブミン、ゼラチン等を例示することができる。医薬的に許容しうるとは、悪心、目眩、吐き気等投与に伴う望ましくない副作用、頻回投与時の製剤に対する免疫応答などがおきないことを意味する。さらに、本発明の抗体に例えば毒素等の物質を結合させた抗体も医薬品として使用可能である。また、医薬的に許容しうる適当な溶剤や希釈剤、安定化剤とともに

に溶解された液状の医薬用組成物でもよい。さらに上記の医薬組成物に加えて生体内における濃度調節を目的とするミクロスフィア、リボソームにおいて非経口（注射）する場合は、抗体および一本鎖抗体で $1\mu\text{g}\sim 50\text{mg}/\text{体重 kg}$ が適当であるがこの範囲に限らない。

なお、上記では抗体を代表例として述べたが、本発明における、E2/NS1 と、HCV 感染性細胞、CD81 発現細胞または CD81 との結合を阻害する物質としては、抗体のほか、抗体以外の蛋白質、硫酸化多糖類または低分子化合物も本発明の活性を損なわない限り、使用可能である。

抗体以外の蛋白質としては、ラクトフェリン等が挙げられ、医薬組成物としての調製や投与方法としては前述の抗体の場合に準ずることが可能である。

また、本発明でいう硫酸化多糖類とは、例えば分子量が平均分子量 5000Da から 1000000Da の範囲のヘパリン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸 A、コンドロイチン硫酸 C、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸 1 およびケラタン硫酸 2 等のいわゆるグリコサミノグリカン類およびデキストラン硫酸等のことを言うが、好ましくは 5000Da から 30000Da 程度の大きさのヘパリンがよい。投与方法は例えば 10000 から 30000 単位を 5%ブドウ糖液、生理食塩水、リンゲル液で希釈した点滴静注、1回 5000 から 10000 単位を 4 から 8 時間ごとに注射開始 3 時間後から 2 から 4 時間ごとに行う間欠静注法、濃厚液製剤を初回 15000 から 20000 単位、続いて維持量 1回 10000 から 15000 単位を 1 日 2 回投与する皮下/筋注が挙げられるが、これに限定されるものではない。

本発明でいう低分子化合物とは、後述の実施例に挙げた suramin 等であるが、HCV の E2/NS1 と HCV の感染を阻止する物質であればこれに限らない。

この低分子化合物の結合部位はさまざまな箇所が考えられるが、上記ヘパリンが結合する箇所に結合する物質であるならば、硫酸基が付加している化合物が好ましい。

ここに挙げた、抗体等の蛋白質、硫酸化多糖類、低分子化合物を医薬品として使用する際、単独で使用する必要はなく、各々の物質について本明細書に記した

範囲内の量で複数の物質を投与することも可能である。

なお、上記一本鎖抗体の場合には、C 型肝炎ウイルスの診断用途として好適に用いることができる。

さらに、本発明は、被験物質の存在下及び非存在下において、HCV に感染性のある細胞と HCV 蛋白を発現している細胞との結合を測定し、被験物質の非存在下での結合と比較する工程を含むスクリーニング方法で得られる C 型肝炎ウイルスの生活環を阻害する物質、並びに被験物質の存在下及び非存在下において、HCV に感染性のある細胞と HCV 蛋白を発現している細胞とが結合した後に、被験物質と HCV に感染性のある細胞又は HCV 蛋白を発現している細胞との融合を測定し、被験物質の非存在下での融合と比較する工程を含むスクリーニング方法で得られる C 型肝炎ウイルスの生活環を阻害する物質に関する。ここで言う、C 型肝炎ウイルスの生活環の例としては、C 型肝炎ウイルスの感染や増殖などがある。

Takikawa らの文献 (Takikawa et al., J. Virol., 74, 5066-5074, 2000) では、HCV に感染性のある細胞 (HepG2) と HCV 蛋白を発現している CHO 細胞の結合および融合を測定することが可能なアッセイ系とそれを用いた HCV 感染機構について記載されている。

本発明で得られた抗体はそのアッセイ系を競合的に中和することが可能な初めて取得された物質である。

細胞融合アッセイ系は、HTLV-1 などでウイルスの細胞融合活性の測定に用いられている系である。本発明のアッセイ系は HCV の細胞融合を擬似的に示した系であるので、本アッセイ系を阻害する物質には HCV の感染を阻止、特に細胞への結合および脱核を阻害する効果が期待される。

実施例

以下本発明を実施例によりさらに詳細に具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

1. E2 の発現

(E2tag 発現ベクターの構築)

HCV J1 クローンの遺伝子 (Genbank 登録番号:D89815) の内 E2/NS1 の HCV ゲノムにおける 384 番目のアミノ酸より 711 アミノ酸からなる部分 100ng を用い、PCR 増幅用プライマーとして動物細胞での分泌を促すシグナルペプチド配列を有する PCR プライマー(5' CCC AAG CTT ACC ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG CTG TGT GGA GCA GTC TTC GTT TCG GCT AGC CAT ACC CGC GTG ACG GGG GGG GTG CAA GG 3' ; 配列番号 3 0) 遺伝子を 5' 側に用い、E-tag の配列を有する PCR プライマー(5' CCC CCT CGA GTC TAG ATT AAC GCG GTT CCA GCG GAT CCG GAT ACG GCA CCG GCG CAC CGG AGA CGA CCG CCG ACC CTA TAC C 3' ; 配列番号 3 1) を遺伝子 3' 側に用い、PCR 反応により DNA(tPA シグナル+E2(384-711)+tag)断片を増幅した。PCR 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler を用い、ポリメラーゼに KOD (東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った) 用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5 %アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片 1 μ g を 1 ユニットの HindIII と XbaI を用いて 50 μ L の系 M (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM MgCl₂) で 37°C で 2 時間反応させて切断し、70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させた。これと、動物細胞用発現ベクター pCDNA3.1(+) (Invitrogen 社より購入) 1 μ g を 1 ユニットの HindIII と XbaI を用いて 50 μ L の系 M (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM MgCl₂) で 37°C で 2 時間反応させて切断し 70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させたものとともに、フェノールとクロロホルムとイソアミルアルコールを 25:24:1 で混合した溶液を酵素液と等量添加し混合し遠心を行い水層のみを回収した (今後この操作をフェノールクロロホルム抽出と呼ぶ)。さらに回収した水層に 10 分の 1 容の 3M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍容のエタノールを混合し -20°C で一晚、もしくは -80°C で 15 分静置し、遠心して DNA 断片を回収した。さらに 70%のエタノールを加えてからデカンテーションを行い、真空乾燥を行った (今後このエタノールを加えて DNA 断片を回収する一連の操作をエタノール沈殿と呼ぶ) 後、5 μ L の滅菌水に回収した DNA 断片を溶かした。

この精製 DNA 断片どうしをリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従った）を用い連結し、大腸菌 JM109 株（宝酒造より購入、反応は説明書に従った）を形質転換し、所望の E2tag 発現プラスミド pE2tag を得た。

(E2tag の動物細胞での発現)

プラスミド pE2tag を保有する大腸菌を 50mL バッフルフラスコで一晩培養した。菌体を 8,000rpm で 10 分遠心により回収し QIAGEN Plasmid Midi kit (QIAGEN 社より購入) を用いて説明書に従いプラスミドを精製した。

さらに精製したプラスミドを lipofectin (LIFETECH 社より購入) を用いて説明書に従い 5%FBS を添加した EX-CELL302(JRH より購入)で培養した CHO DG44 株にトランスフェクションした。CHO DG44 は 5% CO₂ 中 37°Cにて培養した。トランスフェクション 2 日後、細胞を 0.25%トリプシンではがした後、G418 を 400 μ g/mL 添加した EX-CELL302 に細胞を播種した。2 週間程度 G418 添加培地を用いて培地の交換を行い、コロニーが立ち上がってくるのを確認した。

得られた細胞の E2tag の発現の確認は細胞の上清をウェスタンブロッティングする事により確認した。ウェスタンブロッティングはファルマシア社より購入した Anti-E Tag Antibody の説明書に従った。検出抗体には HRP 結合ヤギ抗マウス IgG 抗体を用いた。発光反応は ECL Western blotting detection reagents (アマシャムファルマシアバイオテクより購入) を用いて説明書に従い X 線フィルムに感光させることにより行った。複数得られたクローンのうち発現がもっとも高い細胞を以後の実験に用いた。

(E2tag の精製)

上記の方法で得た E2tag 発現株を EX-CELL302 にて必要量の上清が得られるよう培養した。細胞の対数増殖期が終了した時点で細胞を遠心にて除き上清を回収した。上清はさらに 0.45 μ m のフィルターを用いて混入物を除いた。そのようにして得られた上清は RPAS Purification Module (ファルマシア社より購入) を用い

てアフィニティー精製を行った。精製は RPAS Purification Module に添付の説明書に従い行った。E2tag は RPAS Purification Module に添付の Elution buffer 中に得られるので PBS へ置換した。具体的には、セントリコン 30 (アミコン社より購入) のフィルター上部に上記 E2tag が含まれる Elution 各分を添加し中に含まれる buffer 量が 100 μ L 以下になるまで 5000rpm で遠心を行った。さらに、そこへ PBS を 2mL 程度添加し同様の遠心操作を行った。この操作を 4 回以上繰り返すことにより PBS 中に溶解している E2tag を回収した。

2. NOB assay 系構築

(CD81 発現ベクターの構築)

ヒト CD81 遺伝子(Genbank 登録番号 M33680)の全長 DNA を取得するため、Hela 細胞から精製した mRNA1 μ g から、RT-PCR kit ver2.1(TAKARA 社)を用いて、添付資料に従いランダムプライマーを用い cDNA を合成した。次にこの kit の添付資料に従い、PCR 増幅用プライマーとして 5' 側を GCGCCGCCATGGGAGTGGAGGGCTGC (配列番号 3 2) に設定し、3' 側を CTCAGTACACGGAGCTGTTCCGGA (配列番号 3 3) に設定して PCR 反応を行った。PCR 産物は 0.8%アガロースゲル電気泳動し、目的のバンドを QIAEXII Gel Extraction Kit (QIAGEN 社より購入) を用いて添付の説明書に従い精製した。さらに、TOPO TA Cloning KIT with TOP10F' Cells (インビトロゲン社より購入)を用いて、添付の説明書に従い pCR2.1-TOPO と上記目的 CD81 のフラグメントを結合および大腸菌へのトランスフォーメーションを行い、目的とする pCRhCD81 を得た。さらに、pCRhCD81 1 μ g を 1 ユニットの EcoRI を用いて 50 μ L の系 H (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 2mM MgCl₂) で 37°C 2 時間反応させて切断し、70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させた後 QIAEXII Gel Extraction Kit (QIAGEN 社より購入) を用いて添付の説明書に従い CD81 遺伝子を含むフラグメントを精製した。pCDNA3.1(+)も別途同様の系にて EcoRI 処理し酵素を失活させた後、バクテリアルアルカリフォスファターゼ (TOYOBO 社より購入) を 1 μ L 加え 65°C で 1 時間インキュベートした。その後、フェノールクロロホルム抽出とエ

タノール沈殿で精製後、5 μ L の滅菌水にそれぞれ回収した DNA 断片を溶かした。その上、両断片をリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌 JM109 株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の CD81 発現プラスミド pCDNA3.1(+)/CD81 を得た。

（CD81 発現細胞構築）

プラスミド pCDNA3.1(+)/CD81 を保有する大腸菌を 50mL バッフルフラスコで一晩培養した。菌体を 8000rpm の遠心により QIAGEN Plasmid Midi kit（QIAGEN 社より購入）を用いて説明書に従いプラスミドを精製した。

さらに精製したプラスミドを lipofectin（LIFETECH 社より購入）を用いて説明書に従い 10%FBS を添加した Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium(DMEM)で培養しておいた NIH3T3 株にトランスフェクションした。NIH3T3 は以下すべて 5% CO₂ 中 37°Cにて培養した。トランスフェクション 2 日後、細胞を 0.25%トリプシンではがし、10%FBS と G418 を 800 μ g/mL 添加した DMEM に細胞を播種した。2 週間程度 G418 添加培地を用いて培地の交換を行い、コロニーが立ち上がってくるのを確認した。

得られた細胞株における CD81 発現の確認は下記の操作により行った。得られた細胞株を選択培地中で 6well plate にてコンフルエントになるまで培養した。細胞を PBS/ 0.05%EDTA で一度洗った後、PBS/0.05%EDTA を用いてはがした後 0.1% BSA と 0.1%アサイドを含む PBS（以下 FACS buffer と呼ぶ） 20 μ L に懸濁し、抗 CD81 抗体（ファーマンジェン社より購入）の終濃度が 0.025mg/mL となるように加え混合後、氷上で 1 時間インキュベートした。FACS buffer を 200 μ L 加えた後 3000rpm で遠心して細胞を回収する操作を 2 回繰り返した。回収した細胞を 30 μ L の FACS buffer に懸濁し、FITC 標識ウサギ抗マウス IgG 抗体（カベル社より購入）を終濃度が 0.05mg/mL となるように加え混合後、遮光して氷上で 1 時間インキュベートした。FACS buffer を 200 μ L 加えた後 3000rpm で遠心して細胞を回収する操作を 2 回繰り返した後、200 μ L の FACS buffer に細胞を懸濁して FACScan（ベクトン

ディッキンソン社)により細胞の蛍光量を測定しもっとも蛍光量の大きい細胞を選択し NIH3T3/CD81 と命名した。

(E2tag と Molt-4 または NIH3T3/CD81 との結合確認)

Molt-4 (理研 RCB No.0206) または NIH3T3/CD81 を終濃度 5×10^5 cell/mL とし、E2tag が最終濃度 $50 \mu\text{g/mL}$ 以下となるように濃度をふって混合し 1% の FBS を含む RPMI 1640 中にて $20 \mu\text{L}$ の系で氷上で 1 時間インキュベートした。5% FBS を含む PBS を $200 \mu\text{L}$ 加え、3000rpm で遠心し細胞を回収する操作を 2 回繰り返した。1% の FBS を含む RPMI 1640 にて抗 Etag 抗体を $10 \mu\text{g/mL}$ に希釈し各サンプルに $10 \mu\text{L}$ 加え混合後 1 時間氷上にてインキュベートした。5% FBS を含む PBS を $200 \mu\text{L}$ 加え、3000rpm で遠心し細胞を回収する操作を 2 回繰り返した。5% FBS を含む PBS にて FITC 標識ウサギ抗マウス Igs (カベル社より購入) を終濃度 $25 \mu\text{g/mL}$ となるように希釈した溶液 $10 \mu\text{L}$ を各サンプルに加え混合後 1 時間氷上にてインキュベートした。5% FBS を含む PBS を $200 \mu\text{L}$ 加え、3000rpm で遠心し細胞を回収する操作を 2 回繰り返した。サンプルを 5% FBS を含む PBS を $200 \mu\text{L}$ に懸濁後 FACScan (ベクトンディッキンソン社)により細胞の蛍光量の変化を測定し、E2tag が Molt-4 または NIH3T3/CD81 と結合していることを確認した。

(E2tag と Molt-4 または NIH3T3/CD81 との結合阻止物質の確認)

E2tag の最終濃度 $50 \mu\text{g/mL}$ となるように 1% の FBS を含む RPMI 1640 で希釈した溶液と、1% の FBS を含む RPMI1640 で scFv(本明細書中以下に記載するスクリーニング法で取得された抗体)を $0.125 \mu\text{g/mL} \sim 12.5 \mu\text{g/mL}$ 、ヘパリン (シグマ社製、H 3 3 9 3) を $4 \mu\text{g/mL} \sim 400 \mu\text{g/mL}$ 、スラミン (シグマ社製、S 2 6 7 1) を $50 \mu\text{g/mL} \sim 5000 \mu\text{g/mL}$ の範囲で希釈した溶液をそれぞれ $10 \mu\text{L}$ ずつ混合し、 37°C で 30 分インキュベートした。 1×10^7 cell/mL の濃度に Molt-4 または NIH3T3/CD81 を 1% の FBS を含む RPMI 1640 中に懸濁した溶液 $10 \mu\text{L}$ を混合し 1 時間氷上にてインキュベートした。5% FBS を含む PBS を $200 \mu\text{L}$ 加え、3000rpm で遠心し細胞を回

収する操作を2回繰り返した。1%のFBSを含むRPMI 1640にて抗Etag抗体を10 $\mu\text{g/mL}$ に希釈し各サンプルに10 μL 加え混合後1時間氷上にてインキュベートした。5%FBSを含むPBSを200 μL 加え、3000rpmで遠心し細胞を回収する操作を2回繰り返した。5%FBSを含むPBSにてFITC標識抗マウスIgG(カベル社より購入)を終濃度25 $\mu\text{g/mL}$ となるように希釈した溶液10 μL を各サンプルに加え混合後1時間氷上にてインキュベートした。5%FBSを含むPBSを200 μL 加え、3000rpmで遠心し細胞を回収する操作を2回繰り返した。サンプルを5%FBSを含むPBSを200 μL に懸濁後FACScan(ベクトンディッキンソン社)により細胞の蛍光量の変化を測定し、E2tagとMolt-4またはNIH3T3/CD81の結合が添加した患者血清または抗体で阻止されていることを確認した。

結果を図1から3に示す。図1は、前述のアミノ酸配列で示される抗体の中和活性を示す。図1中、scFv1-1及びscFv1-4は前述のアミノ酸配列で示される抗体に対応し、コントロールは、VLA4認識する一本鎖抗体を示す。図2はヘパリンを用いた場合の中和活性を、図3はスラミンを用いた場合の中和活性を示した図である。

3. 抗体ライブラリーの作製

(HCV治療患者からのmRNAの精製)

採血した血清にE2tagとMolt-4およびNIH3T3/CD81発現細胞との結合を阻止する能力のある抗体を有するHCV治療患者から40mLヘパリン採血を行い、血液を取得した。末梢血リンパ球を分離する為、比重遠心法(Ficoll-Paque:ファルマシア)を行い、 4×10^7 のリンパ球細胞を得た。MACS(第一化学薬品, Miltenyi Biotec GmbH社製)を用いて抗CD19抗体を利用したB細胞精製とを行い、 2.8×10^6 の細胞を得た。精製した細胞のうちのB細胞の純度を確認するため、抗CD19抗体で精製した細胞を染色しフローサイトメトリー解析法にて95%以上の精製度である事を確認した。この精製B細胞を用いて、ヒトIL-2(ジェンザイム)200unit/mL、ヒトIL-10(ジェンザイム)10ng/mL、E2/NS1抗原1ng/mL、抗ヒトCD40抗体(ジェンザイム)1

$\mu\text{g/mL}$ の刺激の元、 5×10^6 B細胞/ ml 10%FCS RPMI の条件で 72 時間培養した。B 細胞の活性化を顕微鏡にて確認し、PBS で 2 回洗浄し、RNAlater (Ambion 社) を用いて説明書に従って操作して B 細胞より mRNA を取得、精製した。

(抗体ライブラリーの作製)

抗体ライブラリー作製は By-Passing Immunization Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage(Journal of Molecular Biology 1991 222 582-597) の記載方法に従い行った。精製した mRNA $1 \mu\text{g}$ から、RT-PCR kit ver2.1(TAKARA 社)を用いて、添付資料に従いランダムプライマーを用い cDNA を合成した。次にこの kit の添付資料に従い、この cDNA を鋳型にし、抗体の H 鎖、L 鎖 (入鎖、 κ 鎖) をそれぞれ PCR で増幅した。抗体遺伝子クローニング用のプライマー及びリンカーは、上記論文の記載に従い作製した物を用いた。PCR 産物は 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、抗体の H 鎖、L 鎖のバンドを切り出した。切り出したアガロースゲルから QIAEX II Gel extraction kit(QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出した。次に抽出した H 鎖、L 鎖、リンカーを同モルになるようにして混合し、連結用プライマーを用いて PCR を行った。PCR は $50 \mu\text{L}$ の系で、Taq polymerase(PerkinElmer 社)1 単位を用い、 94°C で 5 分加熱した後、 94°C 30 秒、 55°C 30 秒、 72°C 30 秒を 30 サイクル、その後 72°C で 5 分間加熱し完了した。PCR 産物は 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、H 鎖、L 鎖、リンカーが一本に連結したバンドを切り出した。切り出したアガロースゲルから QIAEX II Gel extraction kit(QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出した。次に制限酵素 Sfi I と 50 マイクロリットルの系 M (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM MgCl_2) で 55°C 2 時間反応させて切断し、 70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させた。さらに制限酵素 Not I を加え 50 マイクロリットルの系 M (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM MgCl_2) で 37°C 2 時間反応させて切断し、 70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させた。DNA をフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿を順次行い精製し $50 \mu\text{L}$ の滅菌水に溶解した。この DNA 断片 100ng と、 50ng の pCantab5MycHis(pCantab5E (ア

マシャムファルマシア)の Etag 配列を Myc-Histag に入れ換えたベクター)とを、TAKARA 社のリガーゼキットを用いて説明書に従い結合させた。ライゲーションサンプルをフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿で順次精製し 10 μ L の滅菌水に溶解した。この半量を用いて Molecular Cloning(1982)p249, Cold Spring Harbor Labs. に従い形質転換した。こうして 1×10^8 のコロニーを得た。これを一本鎖抗体ライブラリーとして以後用いた。

4. ライブラリーファージのスクリーニング

(ファージの調製)

プレート上に生えている大腸菌を 2ml の 2xTY 液体培地で回収し、そのうち 20 μ l を 20ml の 2xTY 液体培地(100 μ g/L アンピシリンと 2 % グルコースを含む)に加えた。37°C で 200rpm で振とうしながら、吸光度 600nm の値が 1.0 になるまで培養した。この培養液に 1×10^{11} pfu/mL のヘルパーファージ M13K07 を加え、37°C に 30 分静置した。続いて、37°C 200rpm で振とうした。30 分後、溶液を 3000rpm で 10 分間遠心して、大腸菌を回収した。上清を廃棄し、20ml の 2xTY 液体培地(100 μ g/L アンピシリンと 50 μ g/L カナマイシンを含む)に懸濁し、37°C で 200rpm で振とうしながら、一晩培養した。翌日、培養液を 15000rpm で遠心し、大腸菌を沈殿させ、上清を回収した。この上清をファージ溶液として用いた。

(スクリーニング操作)

50mM NaHCO₃(pH9.6)溶液に溶解した、10 μ g/ml の E2 抗原 1ml をプラスチックチューブ(Nunc MaxisorpTube)に加え、4°C に一晩おいた。翌日、抗原溶液を廃棄し、次に PBS 溶液 5ml でそのチューブを洗い、これを 3 回繰り返した。その後 5ml の 5%BSA を加え、37°C に置いた。2 時間後、BSA 溶液を廃棄し、5ml の PBS 溶液でチューブを洗った。次に、用意したファージ溶液 250 μ L と 5%BSA 溶液 750 μ L を混合し、これをチューブに加えて 37°C に置いた。1 時間後、加えた溶液を廃棄し、PBST(0.1%)溶液 5ml でチューブを洗った。これを 20 回繰り返した。次に PBS 溶液

5mL でチューブを洗った。これを 20 回繰り返した。このチューブに 1mL の 100mM トリエチルアミンを加え、室温に 10 分間置いた。その後、トリエチルアミン溶液を回収し、これに 500 μ L の 1MTris-HCl(pH7.5)を加え、よく混合した。この溶液 750 μ L を吸光度 600nm の値が 0.6 になるまで培養した 10mL の大腸菌 TG-1 に加え、37°C に 30 分置いた。続いて、37°C で 200rpm で振とうした。30 分後、溶液を 3000rpm で 10 分間遠心して、大腸菌を回収した。この大腸菌を 2 \times TY プレート培地 (100 μ g/L アンピシリンと 2% グルコースを含む) に撒き、37°C で一晩置いた。翌日、プレート上に生えている大腸菌から、(ファージの調製)に記した操作でファージを回収し、(スクリーニング操作)に記した操作を繰り返した。このスクリーニング操作を 3 回繰り返した。

その結果、配列表の配列番号 1 ~ 29 に記載のアミノ酸配列を有する抗体 ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4 が得られた。

配列表の配列番号 1 ~ 3 は、抗体 ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4 の H 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 4 ~ 6 は、抗体 ScFv1-1 の L 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 7 ~ 9 は、抗体 ScFv1-2 の L 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 10 ~ 12 は、抗体 ScFv1-3 の L 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 13 ~ 15 は、抗体 ScFv1-4 の L 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 16 は、抗体 ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4 の H 鎖のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 17 ~ 20 はそれぞれ、抗体 ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4 の L 鎖のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 21 は、抗体 ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4

のH鎖の塩基配列を示す。

配列表の配列番号22～25はそれぞれ、抗体 ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4 のL鎖の塩基配列を示す。

配列表の配列番号26～29はそれぞれ、抗体 ScFv1-1、ScFv1-2、ScFv1-3、及び ScFv1-4 の塩基配列とアミノ酸配列を示す。

また、H鎖のアミノ酸配列が配列表の配列番号34に記載のアミノ酸配列である抗体 ScFv2-1、ScFv2-2、ScFv2-3、及び ScFv2-4 も得られた。

配列表の配列番号34は、抗体 ScFv2-1、ScFv2-2、ScFv2-3、及び ScFv2-4 のH鎖のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号35は、抗体 ScFv2-1、ScFv2-2、ScFv2-3、及び ScFv2-4 のH鎖の塩基配列を示す。

配列表の配列番号36～39は、抗体 ScFv2-1、ScFv2-2、ScFv2-3、及び ScFv2-4 の塩基配列とアミノ酸配列を示す。

5. ScFv 改変について

(抗体ライブラリーの作製)

抗体ライブラリーの作製は上記した抗体ライブラリー作製の項と同様の手法を用いて行った。

まず、PCantab5scFv3-1MycHis(PCantab5MycHis の Sfi I site と Not I site の間に実施例に示した scFv1-1 遺伝子が挿入されておりL鎖の5' 末にAlw44 I、3' 末に Not I のサイトが配してある)のL鎖部分を HCV 抗原に反応性のないL鎖に入れ替えたベクターを作製した。これを Pcantab5scFv3-1/L-/MycHis と呼ぶ。

精製した mRNA1 μ g から、RT-PCR kit ver2.1(TAKARA 社)を用いて、添付資料に従いランダムプライマーを用い cDNA を合成した。次にこの kit の添付資料に従い、この cDNA を鋳型にし、抗体の L 鎖 (λ 鎖、 κ 鎖) をそれぞれ PCR で増幅した。抗体遺伝子クローニング用のプライマーは、上記論文の記載に従い作製した物を用いた。PCR 産物は 1%アガロースゲルで電気泳動を行い、抗体の H 鎖、L 鎖のバン

ドを切り出した。切り出したアガロースゲルから QIAEX II Gel extraction kit(QIAGEN 社)を用いて DNA を抽出した。

次に制限酵素 Alw44 I と 50 マイクロリットルの系 M (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM MgCl₂) で 37°C 2 時間反応させて切断し、70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させた。さらに制限酵素 Not I を加え 100 マイクロリットルの系 H (10mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 2mM MgCl₂) で 37°C 2 時間反応させて切断し、70°C 10 分の熱処理により酵素を失活させた。DNA をフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿を順次行い精製し 50 μ L の滅菌水に溶解した。この DNA 断片 100ng と、同様に Alw44 I と Not I で処理した 50ng の pCantab5scFv3-1/L-/MycHis とを、TAKARA 社のリガーゼキットを用いて説明書に従い結合させた。ライゲーションサンプルをフェノールクロロホルム抽出とエタノール沈殿で順次精製し 10 μ L の滅菌水に溶解した。この半量を用いて Molecular Cloning(1982)p249, Cold Spring Harbor Labs. に従い形質転換した。こうして 1×10^6 のコロニーを得た。これを一本鎖抗体ライブラリーとして以後用いた。

(ライブラリーファージのスクリーニング)

ファージの調製、スクリーニング操作はすべて上記と同様の操作により行った。

その結果、配列表の配列番号 4 2 ~ 6 5 に記載のアミノ酸配列を有する抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 が得られた。

配列表の配列番号 4 2 ~ 4 4 は、抗体 ScFv3-1 の L 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 4 5 ~ 4 7 は、抗体 ScFv3-2 の L 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 4 8 ~ 5 0 は、抗体 ScFv3-3 の L 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 5 1 ~ 5 3 は、抗体 ScFv3-4 の L 鎖の CDR-1、CDR-2、および CDR-3 のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 5 4 ~ 5 7 はそれぞれ、抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、

及び ScFv3-4 の L 鎖のアミノ酸配列を示す。

配列表の配列番号 58～61 はそれぞれ、抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 の L 鎖の塩基配列を示す。

配列表の配列番号 62～65 はそれぞれ、抗体 ScFv3-1、ScFv3-2、ScFv3-3、及び ScFv3-4 の塩基配列とアミノ酸配列を示す。

6. スクリーニングしたファージからの scFv の調製

100mL の 2×TY 液体培地 (100 μ g/L アンピシリンと 2%グルコースを含む) に候補コロニーを植菌し、30℃で 200rpm で一晩培養した。翌日、900mL の 2×TY 液体培地 (100 μ g/L アンピシリンと 0.1%グルコースを含む) に上記培養液を加え、1 時間 30℃、200rpm で培養した。1mL の 1M IPTG(isopropyl- β -D-thio-galactopyranoside)を加え更に、同条件で 5 時間培養した。培養液を 8000rpm で 10 分間遠心して、菌を沈殿させた。上清を廃棄し、50mL の 50mM Tris-HCl(pH8)、20%Sucrose、1mM EDTA 溶液で沈殿を懸濁させた後、氷中に 15 分間置いた。続いて 10000rpm で 15 分間懸濁液を遠心し、上清を回収し、MgCl₂を 1mM になるように加えた。

7. ScFv の精製

上記大腸菌より取得した ScFv は Ni-NTA agarose (QIAGEN 社より購入) を用いて説明書に従い精製した。1mL の Ni-NTA agarose を 30mL の A 溶液 (50mM Na-phosphate, 300mM NaCl, pH7.4)を加えて洗い、攪拌後 1000rpm で 2 分間遠心し、上清を廃棄した。この Ni-NTA agarose に上記上清を加えた。45 分間、4℃で攪拌し ScFv の His tag 部位と Ni-NTA agarose を結合させた。その後 1000rpm で 2 分間遠心し、上清を廃棄した。30mL の A 溶液を加えて Ni-NTA agarose を洗い、1000rpm で 2 分間遠心し、上清を廃棄した。更に B 溶液 (A 溶液+10mM Imidazole) 30mL で同様な操作で洗った。次に B 溶液 10mL に懸濁し、poly-prep カラム (Bio-Rad 社) に添加した。更に 10mL の B 溶液を添加して Ni-NTA agarose を洗った。完全に洗い液がカラムか

らなくなった後、2ml の C 溶液(A 溶液+250mM Imidazole)で Ni-NTA agarose に結合した ScFv を溶出した。次に、25ml の PBS(10mM phosphate pH7.4、150mM NaCl)で洗った PD10 カラム (アマシャムファルマシア社) に溶出液を添加し、PBS 溶液で溶出し、バッファの交換をした。各溶出画分の 280nm の吸光度を測定し、ScFv 溶出画分を一つにして以後の実験に用いた。

8. ScFv の E2 結合能の確認

50mM NaHCO₃(pH9.6)溶液に溶解した、1 μ g/ml の E2tag 1mL を FALCON の 96well plate に 50 μ L ずつ加え 37°C で 1 時間インキュベートした。この際ブランクの well として同数の E2tag を加えていない buffer のみを加えたものも用意した。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後 0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200 μ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。各 well の水分を切った後、5%BSA を含む PBS 溶液を各 well に 200 μ L ずつ加え 37°C で 1 時間インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後 0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200 μ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。E2tag を加えた well と加えていない well それぞれに取得した scFv を 10 μ g/mL 以下の濃度になるように 1% の BSA を含む PBS にて希釈し各 well に 50 μ L ずつ加え 37°C で 1 時間インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後 0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200 μ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。各 well の水分を切った後、抗 myc-tag 抗体(サンタクルーズバイオテクノロジー社より購入)を最終濃度が 10 μ g/mL になるように 1% の BSA を含む PBS にて希釈し、各 well に 50 μ L ずつ加え 37°C で 1 時間インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後 0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well に 200 μ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。HRP 標識抗マウス Igs を最終濃度が 1 μ g/mL になるように 1%BSA を含む PBS にて希釈し、各 well に 50 μ L ずつ加え室温で 1 時間インキュベートした。各 well の溶液をデカンテーションで廃棄後 0.1% の Tween20 を加えた PBS を各 well

に 200 μ L 加えデカンテーションで廃棄する操作を 5 回繰り返した。OPD buffer 25mL にオルトフェニレンジアミン 10mg、30%過酸化水素水 12.5 μ L を加えた溶液を各 well に 100 μ L ずつ加え十分に発色するまで室温でインキュベートし 4N 硫酸を 100 μ L 加えて反応を停止し 490nm における吸光度を測定することにより scFv が E2tag に結合しているか確認した。

9. 抗体発現ベクター構築

PCR 法により pRC/CMV (Invitrogen 社より購入) の CMV プロモーターを含む領域、マルチクロニングサイト、poly A シグナル配列領域 (同社遺伝子マップ 209-1250 塩基領域を増幅する。使用したプライマーの配列は、5' 側は 5'CCC TGA TCA GAA TTC GCA GGA TCC CTC GAG ACT AGT GAT GAT CGG GCC AGA TAT ACG CG 3' (配列番号 66)、3' 側は 5'CCC TGA TCA AGA TCT GCT AGC GTC GAC TCC CCA GCA TGC CTG CTG CTA TTG 3' (配列番号 67) であり、Applied Biosystems Model 394 用い合成後、定法にて調製した。PCR 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cyclor を用い、ポリメラーゼに KOD (東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った) を用いて行った。その後、所望の約 1.0 Kbp DNA 断片は、5%アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの Bcl I 用いて 50 マイクロリットルの系 H で 37°C 2 時間反応させて切断する。別に ppUC119 (宝酒造社より購入) DNA 1 マイクログラムを 1 ユニットの BamHI を用いて 50 マイクロリットルの系 H で 37°C 2 時間反応させて切断する。切断した DNA 断片と切断したプラスミドをリガーゼキット (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を用い連結し、大腸菌 JM109 株 (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を形質転換し、所望の発現プラスミド pKS1 を得た。

上記で得た pKS1 (1 マイクログラム) を SpeI 1 ユニットを用い 50 マイクロの系 M にて 37°C、2 時間反応させ切断する。

pcDNA3.1/Hygro(+) (Invitrogen 社より購入) を用い、P C R により loxP-Hygromycin 融合遺伝子を増幅する。使用したプライマーの配列は、5' 側は Hyg-stop: cccagatctctattcctttgccctcggacgag (配列番号 68) 3' 側は Hy-atg: ccccaagcttatgaaaaagcctgaactcaccgcg 3' (配列番号 69) であり、サイメディア社に合成を依頼し購入した。P C R 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler を用い、ポリメラーゼに KOD (東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った) を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5% アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの NheI 及び NaeI を用いて 50 マイクロリットルの系 M で 37°C、2 時間反応させて切断する。

pNeo-gal (Stratagene 社より購入) を用い、P C R により TK (A) n を含む DNA を増幅する。使用したプライマーの配列は、5' 側は cccgccggtgggtgtggcgaccgc3' (配列番号 70)、3' 側は 5' cccctctagaaagtataggaacttcaagc 3' (配列番号 71) であり、Applied Biosystems Model 394 用い合成後、定法にて調製した。P C R 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler を用い、ポリメラーゼに KOD (東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った) を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5% アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの XbaI 及び NaeI を用いて 50 マイクロリットルの系 M で 37°C、2 時間反応させて切断する。

切断したプラスミドと切断した loxP-hygromycin DNA 断片と Tk(A)n DNA 断片とを リガーゼキット (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を用い連結し、大腸菌 JM109 株 (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を形質転換し、所望の発現プラスミド pEX loxP-Hyg を得た。

pEX1-3-1W (特願 2000-172684) を用い、P C R により重鎖定常域を含む DNA 断片を増幅する。使用したプライマーの配列は、5' 側は

5' ccccaagcttctcgagactagtagtaccgaaggcccatcggtcttccc3' (配列番号72)、3' 側は 5' ccccgggccctctagtagctttcatttaccggagacaggg3' (配列番号73) であり、サイメディア社に合成を依頼し購入した。PCR 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cyclor を用い、ポリメラーゼに KOD (東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った) を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5% アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの HindIII 及び ApaI を用いて 50 マイクロリットルの系 M で 37°C、2 時間反応させて切断する。

pEX loxP-Hyg DNA 1 マイクログラムを HindIII, ApaI 1 ユニットを用い 50 マイクロの系 M にて 37°C、2 時間反応させ切断する。

切断したプラスミドと切断した重鎖定常域を含む DNA 断片とをリガーゼキット (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を用い連結し、大腸菌 JM109 株 (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を形質転換し、所望の発現プラスミド pEX gamma1 loxP-Hyg を得た。

ScFv1-1 を用い、PCR により重鎖可変域を含む DNA 断片を増幅する。使用したプライマーの配列は、HB1-N 5' ccccaagcttcaccATGAAACACCTGTGGTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTCCTGTC CCAGGTGCAGCTggtgcagtctg3' (配列番号74)、HB1-C 5' cccgctagcACTCGAGACGGTGACCAGGGTGCC3' (配列番号75) であり、サイメディア社に合成を依頼し購入した。PCR 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cyclor を用い、ポリメラーゼに KOD (東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った) を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5% アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの HindIII 及び NheI を用いて 50 マイクロリットルの系 M で 37°C、2 時間反応させ切断する。

pEX gamma1 loxP-Hyg DNA 1 マイクログラムを HindIII, SpeI 1 ユニットを用

い50マイクロの系Mにて37℃、2時間反応させ切断する。

切断したプラスミドと切断した重鎖可変域を含む DNA 断片とをリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌 JM109 株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の発現プラスミド pEX gamma1 loxP-Hyg HCVI を得た（図7）。

pEGFPN2（クローンテック社より購入）を用い、PCRによりカナマイシン耐性遺伝子を含む DNA 断片を増幅する。使用したプライマーの配列は、H鎖5'側は 5'ccccagagctagtcctgcaggcggggaatgtgcgcggaaccct3'（配列番号76）、3'側は 5'ccccgctagcctgcaagtcatttcgaacccagcgtccc3'（配列番号77）であり、サイメディア社に合成を依頼し購入した。PCR反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler を用い、ポリメラーゼに KOD（東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った）を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5%アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約1マイクログラムを1ユニットの SpeI 及び NheI を用いて50マイクロリットルの系Mで37℃、2時間反応させた後、37℃、2時間反応させ切断する。

pKS1 DNA 1マイクログラムを NheI 1ユニットを用い50マイクロの系Mにて37℃、2時間反応させ切断する。

切断したプラスミドと切断したカナマイシン耐性遺伝子を含む DNA 断片とをリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌 JM109 株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の発現プラスミド pEX-1 Km, Amp を得た。

pEX-1 Km, Amp 1 DNA 1マイクログラムを DraI, ScaI 1ユニットを用い50マイクロの系Hにて37℃、2時間反応させ切断する。

切断したプラスミドをリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌 JM109 株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の発現プラスミド pEX-1 Kmを得た。

pCZ0k (T, Shibui ら Appl Microbiol Biotechnol (1993) 38, 770-775 記載) を用い、P C R により軽鎖定常域を含む DNA 断片を増幅する。使用したプライマーの配列は、H 鎖 5' 側は 5' ccccaagcttctagagtcgacggtaccgtggaaatcaaacgaactgtgg3' (配列番号 78)、3' 側は 5' ccccgggccctctagcgccgcctaacactctcccctgttgaagc3' (配列番号 79) であり、サイメディア社に合成を依頼し購入した。P C R 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cyclor を用い、ポリメラーゼに KOD (東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った) を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5% アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方法により精製した。精製 DNA 断片約 1 マイクログラムを 1 ユニットの HindIII 及び ApaI を用いて 50 マイクロリットルの系 M で 37°C、2 時間反応させ切断する。

pEX-1 Km DNA 1 マイクログラムを HindIII, ApaI 1 ユニットを用い 50 マイクロの系 M にて 37°C、2 時間反応させ切断する。

切断したプラスミドと切断した軽鎖定常域を含む DNA 断片とをリガーゼキット (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を用い連結し、大腸菌 J M 109 株 (宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った) を形質転換し、所望の発現プラスミド pEXkappa Km を得た。

s c F v 1-1 を用い、P C R により軽鎖可変域を含む DNA 断片を増幅する。使用したプライマーの配列は、LK1-N 5' cccaagcttcaccATGGCGTTGCAGACCCAGGTCTTCATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTGGTGCCTACGGGgacatccagatgacccagtctcc3' (配列番号 80) , LK1-C 5' CcccgtagcTTTGATTCCACCTTGGTCCCCCG3' (配列番号 81) であり、サイメディア社に合成を依頼し購入した。P C R 反応は、Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cyclor を用い、ポリメラーゼに KOD (東洋紡社より購入、反応条件は説明書に従った) を用いて行った。その後、所望の DNA 断片は、5% アクリルアミド電気泳動法を用い Molecular Cloning セクション 6.46-6.48, Cold Spring Harvor 記載の方

法により精製した。精製DNA断片約1マイクログラムを1ユニットのHindIII及びBsiWIを用いて50マイクロリットルの系Mで37℃、2時間反応させた後、50℃、2時間反応させ切断する。

pEX kappa Km DNA 1マイクログラムをHindIII, Asp187 I 1ユニットを用い50マイクロの系Mにて37℃、2時間反応させ切断する。

切断したプラスミドと切断した重鎖可変域を含むDNA断片とをリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌JM109株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の発現プラスミドpEX kappa Km HCVIを得た。（図8）

pEX kappa Km HCVI DNA 1マイクログラムをSpeI, NheI 1ユニットを用い50マイクロの系Mにて37℃、2時間反応させ切断する。

pEX gamma1 loxP-Hyg HCVI DNA 1マイクログラムをNheI 1ユニットを用い50マイクロの系Mにて37℃、2時間反応させ切断する。

上記切断したプラスミドををリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌JM109株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望のプラスミドpEX loxp-Hyg HCVI W Kmを得た。

pEX loxp-Hyg HCVI W Km 1 DNA 1マイクログラムをSse8387 1ユニットを用い50マイクロの系Mにて37℃、2時間反応させ切断する。

切断したプラスミドをリガーゼキット（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を用い連結し、大腸菌JM109株（宝酒造より購入、反応は説明書に従い行った）を形質転換し、所望の発現プラスミドpEX loxp-Hyg HCVI Wを得た（図9）。

10. 高発現部位検索株への抗体遺伝子の部位特異的導入

Mkamp 1株（特願2000-172684記載の株）を用いて説明書に従いpBS185（部位特異的組み換え酵素発現プラスミド、Lifetech社より購入）、pEX loxp-Hyg HCVI

W をトランスフェクトした（それぞれ 200 万個の細胞対し 1.0 マイクロigram の DNA を用いた）。5 % FBS（牛胎児血清:Lifetech 社より購入）を含む CHO-S-SFM-II 地(Lifetech 社より購入)にて 37℃、5 %CO₂条件下で、48 時間培養後、200mg/l のハイグロマイシン(SIGMA 社より購入)を加えた同培地により、37℃、5 %CO₂条件下で、25 日間選択培養し、ハイグロマイシン耐性コロニーを選択した（MkmpHCV 1 株）。

1.1. ELISA assay を用いた抗体生産量の測定

抗ヒト免疫グロブリンヤギ抗体（Zymed 社より購入）溶液（溶液 1 で 10 μg/ml に希釈）を 50 μl/well で 96well プレートに加え、37℃で 2 時間処理した。その後、well の溶液をすて、各 well に 250 μl の溶液 2 を加え、4℃で 16 時間以上保温した。溶液除去後、溶液 3 で各 well を 5 回ずつ洗浄し、溶液 4 で希釈した抗体（スタンダード）もしくは試料溶液（培養上清を溶液 4 で任意に希釈したもの）を 50 μl/well で加えて、37℃で 2 時間保温した。溶液除去、溶液 3 で 5 回洗浄後、溶液 5 を 50 μl/well で加え、20℃で 40 分間保温した。液除去、PBS で 5 回洗浄後、溶液 9 を 100 μl/well で加えて室温で遮光して約 5 分間反応させた。等量の 10%硫酸を加えて反応を停止させた後、イムノリーダー（Inter Med 社製、Immuno Reader NJ-2000）を用いて各 well の 11=490nm 及び 12=650nm における吸光度 A1 及び A2 を測定し、(A1-A2) を求めた。希釈標準溶液を用いて検量線を作製し、サンプル中の 1-3-1 抗体（スタンダードとして用いた）の濃度を測定した。各溶液の組成は以下の通りである。

溶液 1 : 0.1% Sodium Azide を含む PBS

溶液 2 : 1% BSA、0.1% Sodium Azide を含む PBS

溶液 3 : 0.05% の Tween20 を含む PBS

溶液 4 : 1% BSA を含む PBS

溶液 5 : HRP 標識抗ヒト免疫グロブリンヤギ抗体（Zymed 社より購入）原液 2 μl を 10ml の溶液 4 に溶かしたもの（用時調製）

溶液 6 : リン酸－水素ナトリウム 14.2g を取り、水を加えて 500ml とする

溶液 7 : クエン酸 1 水和物 10.5g を取り水を加えて 500ml とする

溶液 8 : 溶液 5 257ml に溶液 6 を 243ml 加え、水を加えて 1000ml とする

溶液 9 : 0-フェニレンジアミン (和光純薬より購入) 4.0mg を取り、溶液 7 を 10ml 及び 30% (v/v) 過酸化水素溶液 5 マイクロリットルを加えて溶かす (調製後 10 分以内に用いた)

12. MKamp 株へ抗体発現遺伝子を部位特異的に導入した株の抗体生産性

上記 ELISA 法により以下の生産量が認められた。

親株名	抗体遺伝子導入株		
	蛍光	ハイグロマイシン耐性	抗体生産性
MKamp 1	なし	耐性	10 mg/l

13. 組み換え whole 抗体の性格付け

一本鎖抗体の抗原に対する親和性、中和活性を測定した時と同様の方法にて取得精製した組み換え whole 抗体に対する値を測定した。

$K_d = 2 \times 10^{-9}$ 中和活性 $IC_{50} = 25\text{mg/l}$

得られた組み換え whole 抗体を whole 抗体 1-1 と称し、その重鎖と軽鎖のアミノ酸配列及び塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号 40 及び 41 に記載する。

14. 細胞融合アッセイ

細胞融合アッセイは Takikawa らの方法に従った (Takikawa et al., J. Virol., 74, 5066-5074, 2000)。組換え E1 および E2 蛋白を細胞表面に発現する CHO 細胞 (Matsuura et al., unpublished) をコラーゲンコートした 96 well plate の各ウェルに 2 万個ずつ接種し 5% CO₂ 存在下 37°C で培養する。細胞を準備する際には、トリプシンを使用せず 10 mM EDTA 添加リン酸緩衝食塩水 (PBS)

に 5 分間浸してから、できるだけ細胞が分散するようにフラスコを震盪し、ゆっくりとピペティングしながら剥がす。24 時間培養後、細胞を 200 μ L の Opti-MEM (Gibco BRL) で 2 回洗い、T7 プロモーターの下流にホタルのルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだリポータープラスミド pT7EMCLuc (Aoki et al., Virology, 250, 140-150, 1998) と遺伝子導入効率の標準化のために CMV プロモーターの下流に海椎茸のルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ pRL-CMV (Promega) を Trans IT-LT1 (Mirus) を用いて細胞へ導入する。1 plate あたり以下の組成で用意し、15 分間静置後、1 well あたり 30 μ L ずつ添加する。2 時間後 10% 血清添加 D-MEM (Gibco) を 150 μ L ずつ添加し培養を継続する。

Opti-MEM	3 ml
Trans IT-LT1	50 μ L
pT7EMCLuc	9 μ g
pRL-CMV	0.6 μ g

細胞融合反応の受容細胞としては、ヒト肝細胞癌由来の HepG2 細胞を用いる。HepG2 細胞を 6 well plate の各ウエルに 8.0×10^5 個ずつ接種し、5% CO₂ 存在下 37°C で培養する。24 時間培養後に、T7 RNA ポリメラーゼを発現するプラスミド pCAGT7pol (Ishii et al., unpublished) を各ウエルあたり、以下の組成で細胞に導入し、2 時間後に 10% 血清添加 D-MEM を 1.5 ml 添加する。24~36 時間培養後、細胞をトリプシンで剥がし、25~30ml の 10% 血清添加 D-MEM に浮遊後、50ml の遠心管に移し、5% CO₂ 存在下 37°C で、震盪機の上で一晩浮遊培養する。

Opti-MEM	100 μ L
Trans IT-LT11	5 μ L
pCAGT7pol	1 μ g

96 well plate に用意したリポータープラスミドを導入した HCV エンベロープ蛋白を発現する CHO 細胞(トランスフェクト 48 時間後)の上に、T7RNA ポリメラーゼを発現するプラスミドを導入して一晩浮遊培養した HepG2 細胞を、 $2 \times 10^4/100 \mu\text{L}$ ずつ各ウエルに加える。5 時間培養後、メディウムを捨て、 $100 \mu\text{L}$ の pH 5.0 の PBS に 2 分間浸した後、直ちにその液を捨て、10% 血清添加 D-MEM を $200 \mu\text{L}$ ずつ各ウエルに加え培養を継続する。培養 5 時間後に細胞を dual-luciferase reporter assay system (Promega) を用いて、添付プロトコールに従いルシフェラーゼ活性を測定し、細胞融合活性を評価した。

1 5. 細胞融合阻止アッセイ

抗体による細胞融合阻止活性を調べる場合は、上記の細胞融合阻アッセイと基本的には同じであるが、CHO 細胞に HepG2 細胞を加える前に、Opti-MEM で HepG2 細胞を 2 回洗浄後、Opti-MEM で段階希釈した被検抗体 (whole 抗体 1-1) と 60 分反応させてから共培養を行った。その後同様にルシフェラーゼ活性を測定し、細胞融合阻止活性を評価した。その結果、NOB 活性を示した単鎖抗体を基に作製した完全抗体の中に、HCV のエンベロープ蛋白による細胞融合を特異的に阻止するものが認められた。

1 6. BIACORE X による結合定数の測定

BIACORE X による取得 ScFv の結合定数の測定は添付の説明書に従い行った。

E2tag をセントリコン 30 を用いて 10mM 酢酸 buffer (pH=5.0) に置換した。この E2tag ($100 \mu\text{g/mL}$ 、 $20 \mu\text{L}$) をセンサーチップ CM5 (ピアコア社より購入) のそれぞれ異なるレーンに $5 \mu\text{L/min}$ で送液することによりアミノカップリング法にて固定化し、E2tag 固定化センサーチップを得た。ScFv1-1 をセントリコン 30 を用いて HBS buffer (10mM HEPES (pH7.4), 0.15M NaCl, 3.4mM EDTA, 0.005% Tween 20) に置換した。BIACORE X (ピアコア社) を用いて、先に作製した E2tag センサーチ

チップ上に、この scFv1-1 溶液を $5\mu\text{L}/\text{min}$ にて送液し結合時のセンサグラムを得た。その後、HBS buffer のみを $5\mu\text{L}/\text{min}$ にてセンサーチップに送液し解離時のセンサグラムを得た。これらのセンサグラムの解析により E2tag と scFv1-1 の結合定数 $4.5 \times 10^8(\text{M})$ 、解離定数 $2.2 \times 10^{-9}(\text{M})$ を得た。

17. E2tag とヘパリンの結合確認

E2tag に硫酸化多糖類と結合する箇所があることを確認する方法としてヘパリンが共有結合されているカラム Heparin-Sepharose CL-6B (ファルマシア社より購入) に E2tag が結合することを確認した。Heparin-Sepharose CL-6B は 0.15M NaCl , 10mM リン酸バッファー(pH 7.0)を用いて平衡化した。

$50\mu\text{L}$ の系にて PBS に溶けている E2tag $2\mu\text{g}$ と高分子量ヘパリン (SIGMA 社より購入) $300\mu\text{g}$ 、または Heparin (SIGMA 社より購入) $300\mu\text{g}$ を混合し 37°C で 1 時間攪拌しながらインキュベートした。その際コントロールとして E2tag のみでインキュベートするサンプルも用意した。 $10,000\text{rpm}$ で 5 分遠心し上清のみを他の容器に分注した。 $100\mu\text{L}$ の 0.15M NaCl , 10mM リン酸バッファー(pH 7.0)を加えた後、遠心して上清を他の容器に移す操作を 5 回繰り返した。 0.5M NaCl , 10mM リン酸バッファー(pH 7.0)を $50\mu\text{L}$ 加え室温で 5 分攪拌後遠心し上清を他の容器に移した。 1.5M NaCl , 10mM リン酸バッファー(pH 7.0)を $50\mu\text{L}$ 加え室温で 5 分攪拌後遠心し上清を他の容器に移した。Sample buffer を $50\mu\text{L}$ 加え 100°C で 5 分インキュベートした後遠心し上清を他の容器に移した。

他の容器に移した溶出サンプルを 10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、E2tag 発現株構築の項と同様の方法でウェスタンブロッティングを行いいずれの溶出各分に E2tag が存在するか確認した結果、E2tag のみを Heparin-Sepharose CL-6B と混合した時は E2tag はすべてカラムに結合していることが分かり、Heparin-Sepharose CL-6B と混合する前に高分子量ヘパリンまたは、ヘパリンとインキュベートした時は E2tag のカラムへの結合が阻害されることが確認された。この結果は E2tag および E2 にヘパリンと強く結合する箇所があることを示してい

る。

産業上の利用の可能性

本発明によると、HCV の感染阻止作用などの抗ウイルス効果を有する新規な医薬品が提供可能である。

請求の範囲

1. C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と、C型肝炎ウイルスの感染性のある細胞、CD81 を発現する細胞または CD81 との結合を阻害する物質。
2. C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白のプラスチャージを有する領域に結合することにより、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白と、C型肝炎ウイルスの感染性のある細胞、CD81 を発現する細胞または CD81 との結合を阻害することを特徴とする請求項 1 に記載の物質。
3. C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白が、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に該 E2/NS1 蛋白を認識可能な物質をつけた蛋白であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の物質。
4. C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白が、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に蛍光法または発色法により該 E2/NS1 蛋白を検出可能な物質をつけた蛋白であることを特徴とする請求項 1 から 3 のいずれかに記載の物質。
5. C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白が、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白にタグをつけた蛋白であることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれかに記載の物質。
6. C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白が、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白の C 末端にタグをつけた蛋白であることを特徴とする請求項 5 に記載の物質。
7. CD81 を発現する細胞が、ヒト CD81 を発現する細胞であることを特徴とする請求項 1 から 6 のいずれかに記載の物質。
8. CD81 が、可溶化発現したヒト CD81 であることを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれかに記載の物質。
9. C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白との結合定数が 10^8 以上であるか解離定数が 10^{-8} 以下であることを特徴とする請求項 1 から 8 のいずれかに記載の物質。
10. 結合定数が 10^9 以上であるか、または、解離定数が 10^{-9} 以下であることを特徴とする請求項 9 に記載の物質。
11. 物質が、蛋白質、硫酸化多糖類または低分子化合物であることを特徴とする請求項 1 から 10 のいずれかに記載の物質。

12. 蛋白質が、抗体であることを特徴とする請求項11に記載の物質。
13. 抗体が、C型肝炎治癒患者のB細胞由来であることを特徴とする請求項12に記載の物質。
14. 抗体が、C型肝炎治癒患者のB細胞の遺伝子由来であることを特徴とする請求項13に記載の物質。
15. C型肝炎治癒患者が自然治癒患者であり、B細胞が末梢血単核球細胞であることを特徴とする請求項13又は14に記載の物質。
16. H鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号：1、2及び3に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：1、2及び3に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体。
17. 配列表の配列番号：16又は34に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：16又は34に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項16記載の抗体。
18. L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号：4、5及び6に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：4、5及び6に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体。
19. 配列表の配列番号：17に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：17に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項18記載の抗体。
20. L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号：7、8及び9に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：7、8及び9に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加

されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体。

21. 配列表の配列番号：18に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：18に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項20記載の抗体。

22. L鎖の可変領域の CDR-1、CDR-2 及び CDR-3 がそれぞれ配列表の配列番号：10、11及び12に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：10、11及び12に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体。

23. 配列表の配列番号：19に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：19に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項22記載の抗体。

24. L鎖の可変領域の CDR-1、CDR-2 及び CDR-3 がそれぞれ配列表の配列番号：13、14および15に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：13、14及び15に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体。

25. 配列表の配列番号：20に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：20に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項24記載の抗体。

26. L鎖の可変領域の CDR-1、CDR-2 及び CDR-3 がそれぞれ配列表の配列番号：42、43及び44に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：42、43及び44に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する抗体。

27. 配列表の配列番号：54に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：

54に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項26記載の抗体。

28. L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号：45、46及び47に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：45、46及び47に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体。

29. 配列表の配列番号：55に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：55に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項28記載の抗体。

30. L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号：48、49及び50に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：48、49及び50に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体。

31. 配列表の配列番号：56に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：56に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項30記載の抗体。

32. L鎖の可変領域のCDR-1、CDR-2及びCDR-3がそれぞれ配列表の配列番号：51、52および53に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：51、52及び53に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体。

33. 配列表の配列番号：57に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：57に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする請求項32記載の抗体。

34. 重鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号：40に記載のアミノ

酸配列を含むか、配列番号：40に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体。

35. 軽鎖のアミノ酸配列として、配列表の配列番号：41に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：41に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含み、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する抗体。

36. 配列表の配列番号：26、27、28又は29に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：26、27、28又は29に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する一本鎖抗体。

37. 配列表の配列番号：36、37、38又は39に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：36、37、38又は39に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する一本鎖抗体。

38. 配列表の配列番号：62、63、64又は65に記載のアミノ酸配列を含むか、配列番号：62、63、64又は65に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を含むことを特徴とする、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対して親和性を有する一本鎖抗体。

39 請求項1.6から38のいずれかに記載の抗体をコードする核酸。

40. 配列表の配列番号：21、22、23、24、25、35、58、59、60、61のいずれかに記載の塩基配列を含有する、請求項39に記載の核酸。

41. 配列表の配列番号：40又は41に記載の塩基配列を含有する、請求

項 3 9 に記載の核酸。

4 2. 配列表の配列番号：2 6、2 7、2 8、2 9 のいずれかに記載の塩基配列を含有する、請求項 3 9 に記載の核酸。

4 3. 配列表の配列番号：3 6、3 7、3 8、3 9 のいずれかに記載の塩基配列を含有する、請求項 3 9 に記載の核酸。

4 4. 配列表の配列番号：6 2、6 3、6 4、6 5 のいずれかに記載の塩基配列を含有する、請求項 3 9 に記載の核酸。

4 5. 請求項 3 9 から 4 4 のいずれかに記載の核酸を用いた抗体の生産方法。

4 6. 請求項 4 5 の方法によって得ることができ、C 型肝炎ウイルスの E2/NS1 蛋白に対して親和性を有する組換え抗体。

4 7. 抗体の Fc 領域がヒト型である請求項 4 6 に記載の組換え抗体。

4 8. 抗体が 1 本鎖抗体である請求項 4 6 または 4 7 のいずれかに記載の組換え抗体。

4 9. 請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の物質を有効成分として含有する医薬。

5 0. 請求項 1 6 から 3 8 のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する医薬。

5 1. 請求項 4 6 から 4 8 のいずれかに記載の組換え抗体を有効成分として含有する医薬。

5 2. C 型肝炎の治療および/または予防のための請求項 4 9 から 5 1 のいずれかに記載の医薬。

5 3. C 型肝炎の診断のための請求項 4 9 から 5 1 のいずれかに記載の医薬。

5 4. 請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の物質を有効成分として含有する抗 H C V 剤。

5 5. 請求項 1 6 から 3 8 のいずれかに記載の抗体を有効成分として含有する抗 H C V 剤。

5 6. 請求項 4 6 から 4 8 のいずれかに記載の組換え抗体を有効成分として

含有する抗HCV剤。

57. C型肝炎治癒患者のB細胞を刺激し、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に対する抗体のmRNAを発現させた上で、該B細胞から抗体mRNAおよび抗体cDNAを取得し、該E2/NS1に結合する抗体の可変領域の配列を取得する方法。

58. C型肝炎治癒患者が自然治癒患者であり、B細胞が末梢血単核球細胞であることを特徴とする請求項57に記載の抗体の可変領域の配列を取得する方法。

59. 請求項57又は58に記載の方法で取得された可変領域の配列を有する抗体。

60. 被験物質の存在下及び非存在下において、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白と、C型肝炎ウイルスの感染性のある細胞、CD81を発現する細胞またはCD81とを接触させる工程；並びに被験物質の存在下及び非存在下におけるC型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白と、C型肝炎ウイルスの感染性のある細胞、CD81を発現する細胞またはCD81との結合を比較する工程を含む、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白と、C型肝炎ウイルスの感染性のある細胞、CD81を発現する細胞またはCD81との結合を阻害する物質のスクリーニング方法。

61. C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白が、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に該E2/NS1蛋白を認識可能な物質をつけた蛋白であることを特徴とする請求項60に記載のスクリーニング方法。

62. C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白が、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白に蛍光法または発色法により該E2/NS1蛋白を検出可能な物質をつけた蛋白であることを特徴とする、請求項60又は61に記載のスクリーニング方法。

63. C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白が、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白にタグをつけた蛋白であることを特徴とする請求項60から62のいずれかに記載のスクリーニング方法。

64. C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白が、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白のC末端にタグをつけた蛋白であることを特徴とする請求項63に記載のスクリー

ニング方法。

65. CD81を発現する細胞が、ヒトCD81を発現する細胞であることを特徴とする請求項60から63のいずれかに記載のスクリーニング方法。

66. CD81が、可溶化発現したヒトCD81であることを特徴とする請求項60から63のいずれかに記載のスクリーニング方法。

67. 被験物質が、蛋白質、硫酸化多糖類または低分子化合物であることを特徴とする請求項60から66のいずれかに記載のスクリーニング方法。

68. 請求項60から67のいずれかに記載のスクリーニング方法により得られる、C型肝炎ウイルスのE2/NS1蛋白と、C型肝炎ウイルスの感染性のある細胞、CD81を発現する細胞またはCD81との結合を阻害する物質。

69. 被験物質の存在下及び非存在下において、HCVに感染性のある細胞とHCV蛋白を発現している細胞との結合を測定し、被験物質の非存在下での結合と比較する工程を含むスクリーニング方法で得られるC型肝炎ウイルスの生活環を阻害する物質。

70. 被験物質の存在下及び非存在下において、HCVに感染性のある細胞とHCV蛋白を発現している細胞とが結合した後に、被験物質とHCVに感染性のある細胞又はHCV蛋白を発現している細胞との融合を測定し、被験物質の非存在下での融合と比較する工程を含むスクリーニング方法で得られるC型肝炎ウイルスの生活環を阻害する物質。

71. 被験物質が蛋白質、硫酸化多糖類または低分子化合物である請求項69又は70に記載のC型肝炎ウイルスの生活環を阻害する物質。

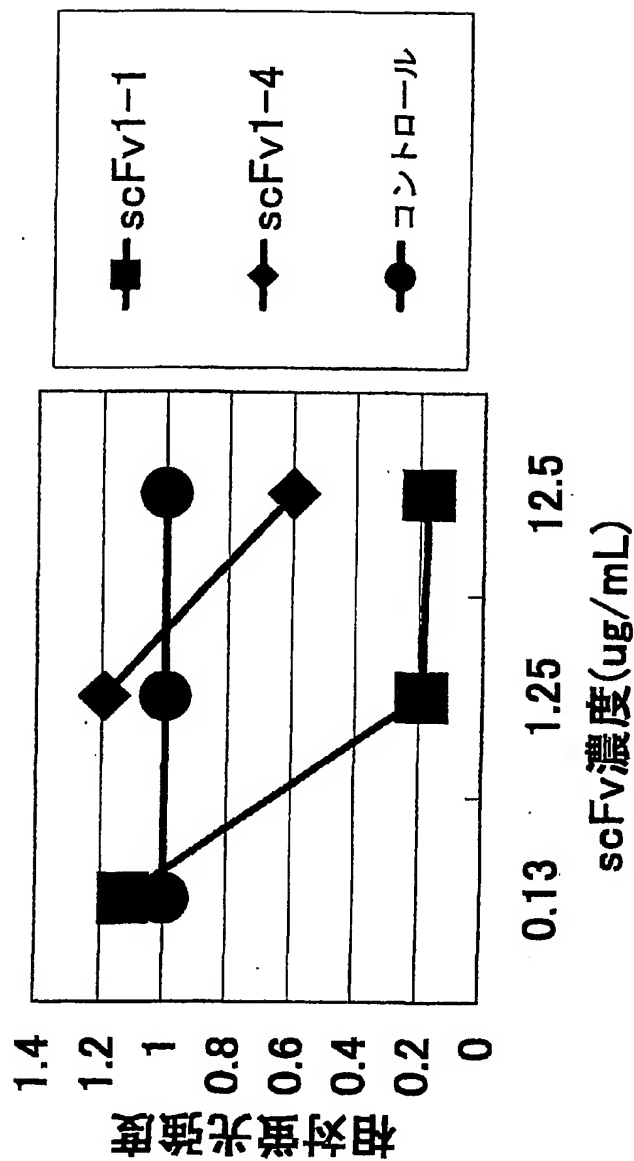
72. 請求項68から71のいずれかに記載の物質を有効成分として含む、抗HCV剤。

73. 請求項68から71のいずれかに記載の物質を用いて、抗HCV剤を製剤化することを含む抗HCV剤の製造方法。

74. 請求項68から71のいずれかに記載されているスクリーニング方法を用いてC型肝炎ウイルスの増殖を阻害することを確認する工程を含む、請求項

7 3 に記載の抗 H C V 剤の製造方法。

第1図



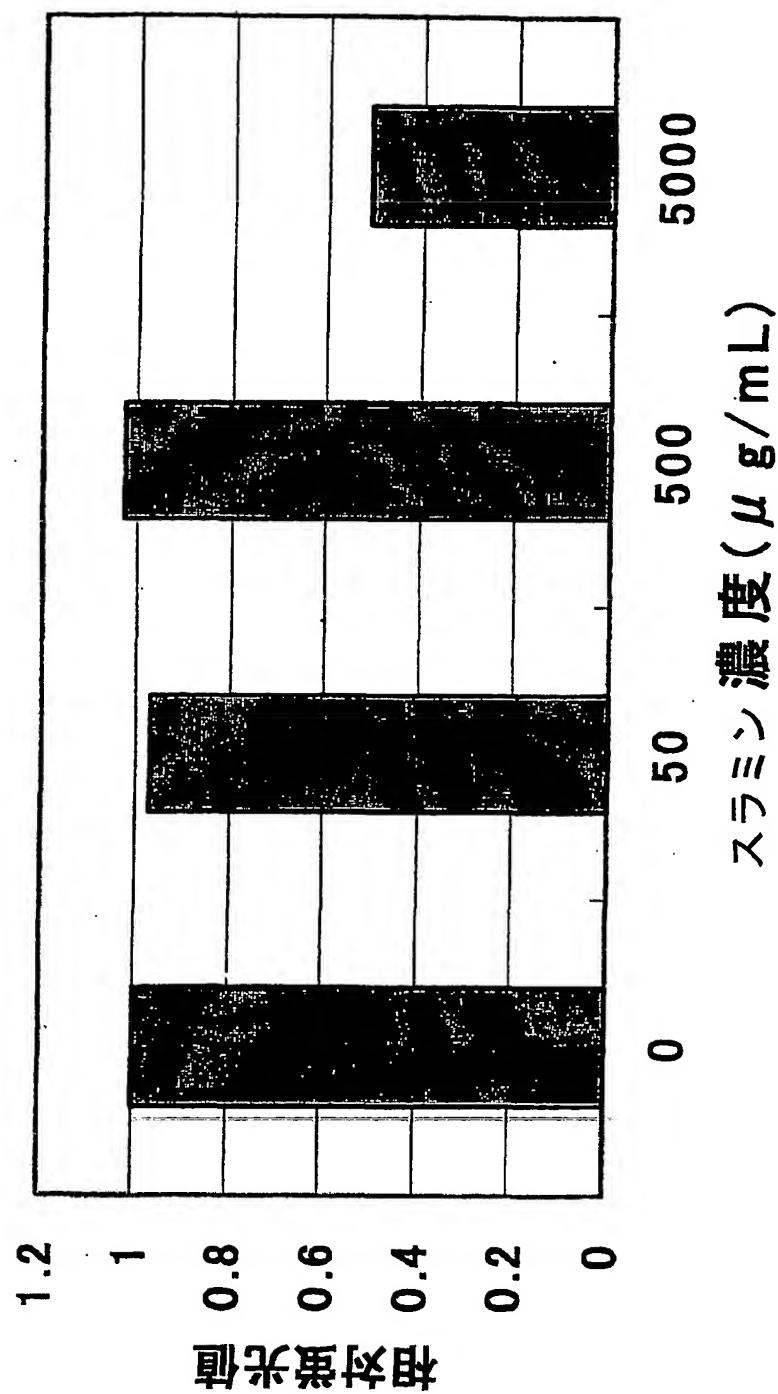
scFv の NOB 活性測定

第2図



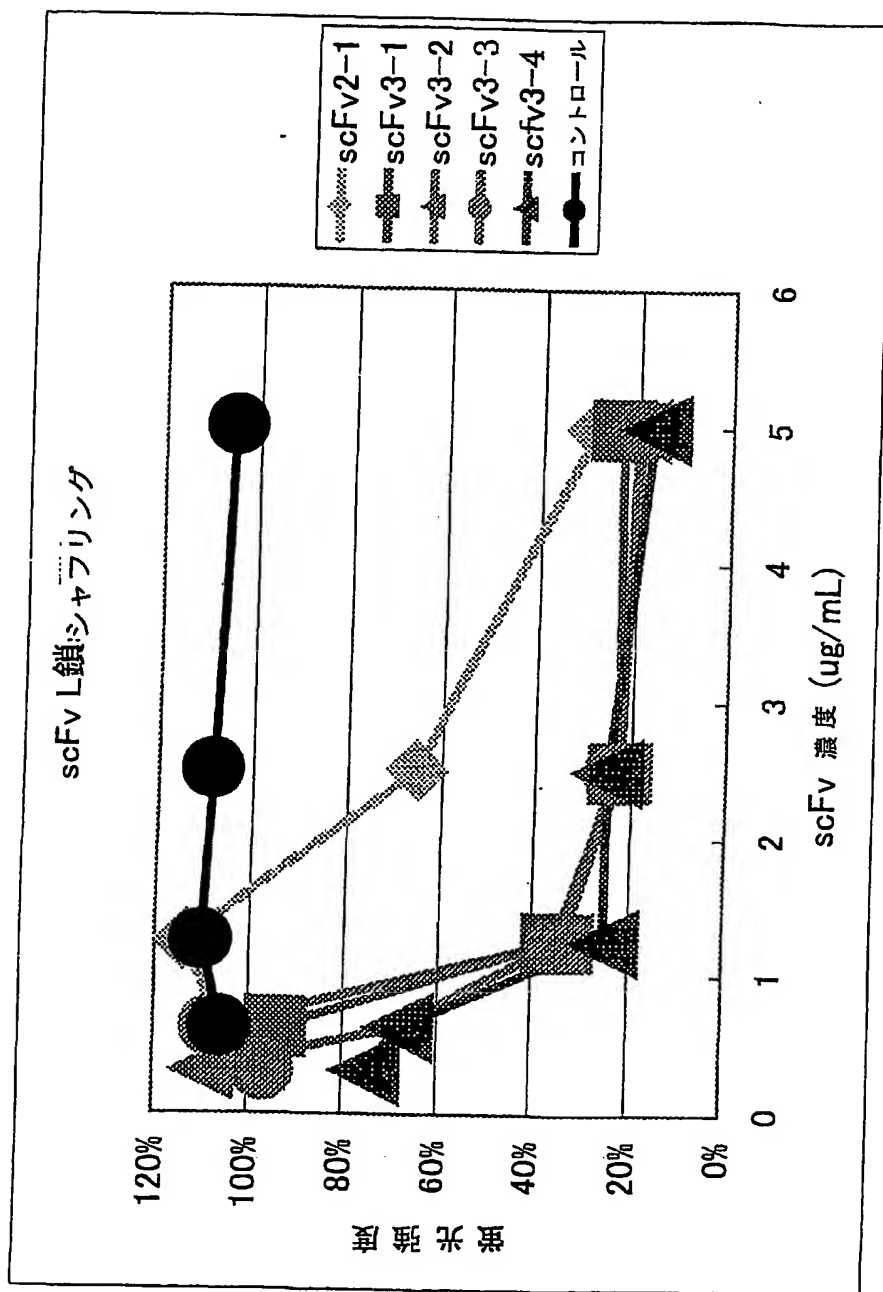
ヘパリンの中和活性の確認

第3図

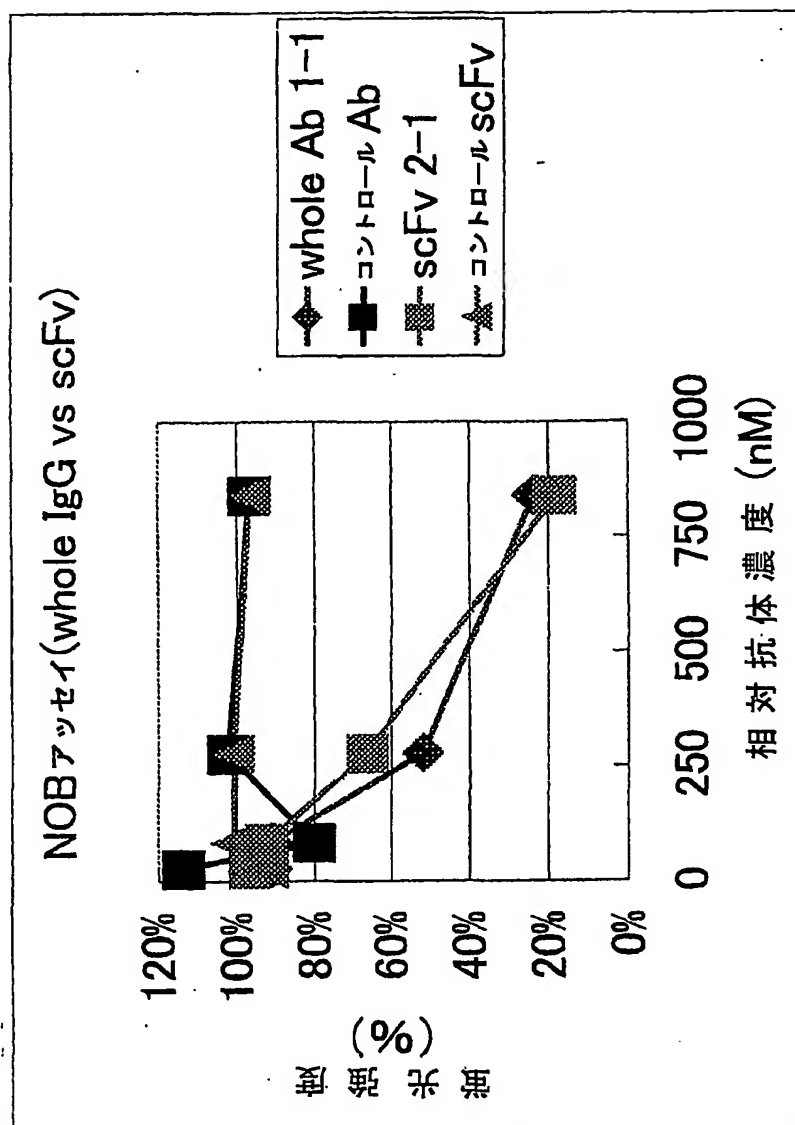


スラミンの中和活性確認

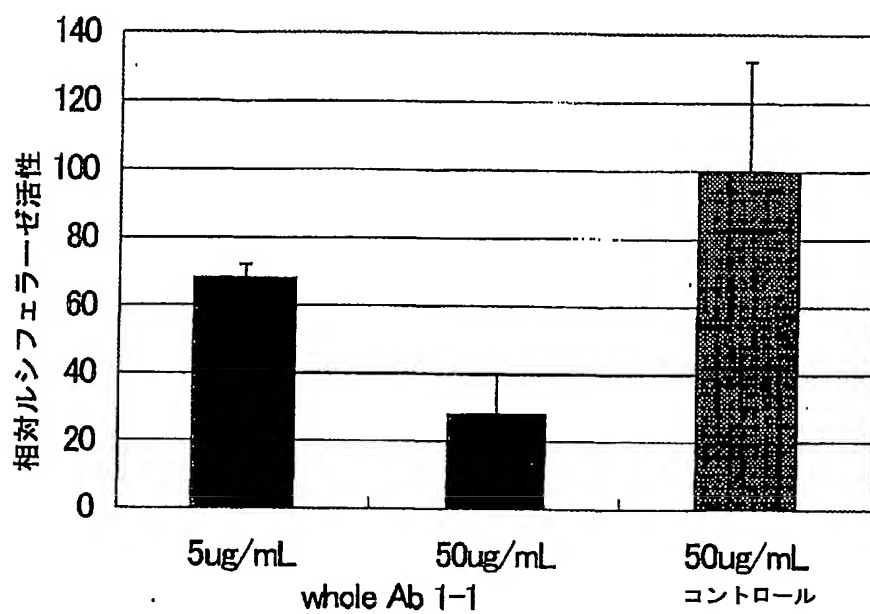
第4図



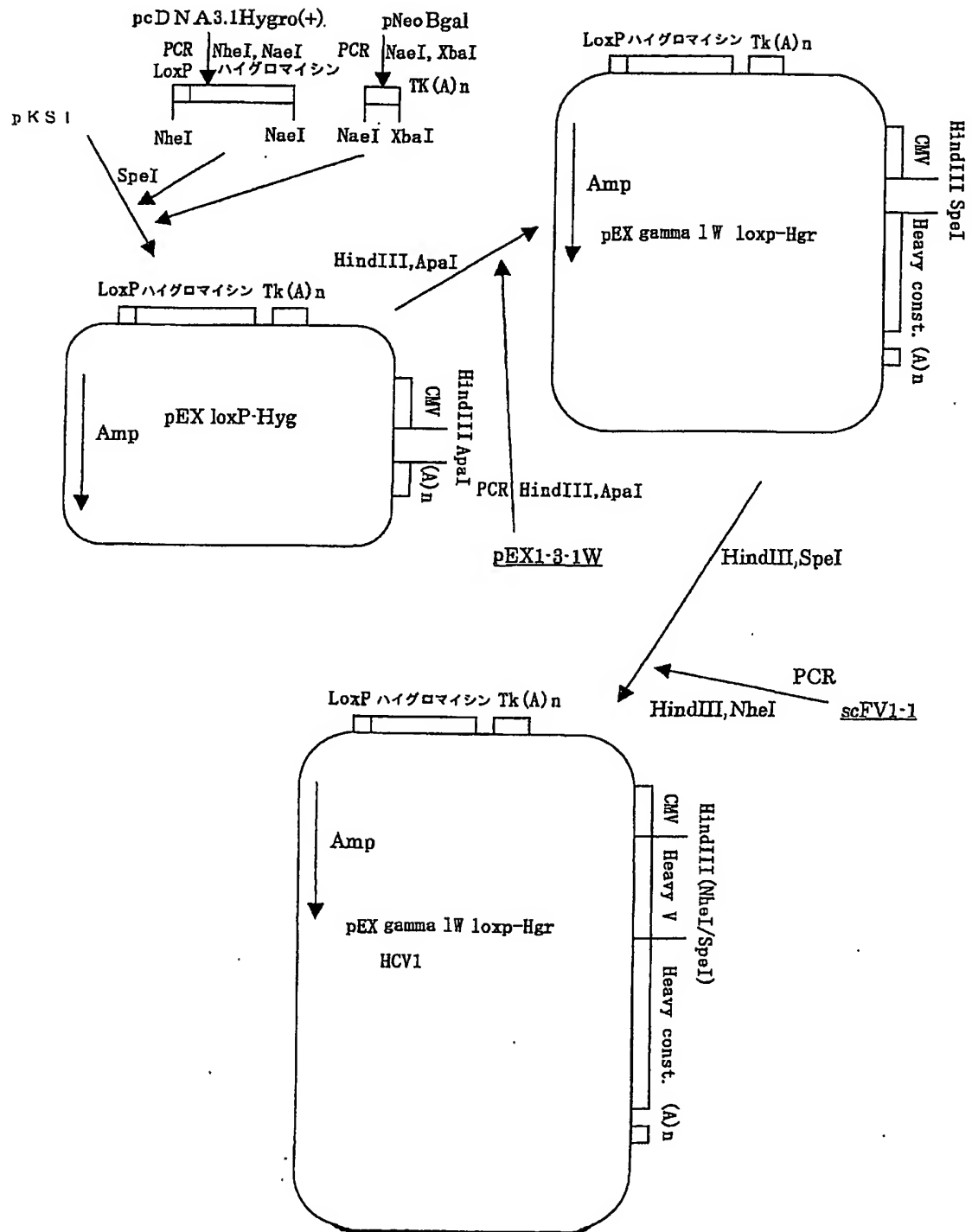
第5図



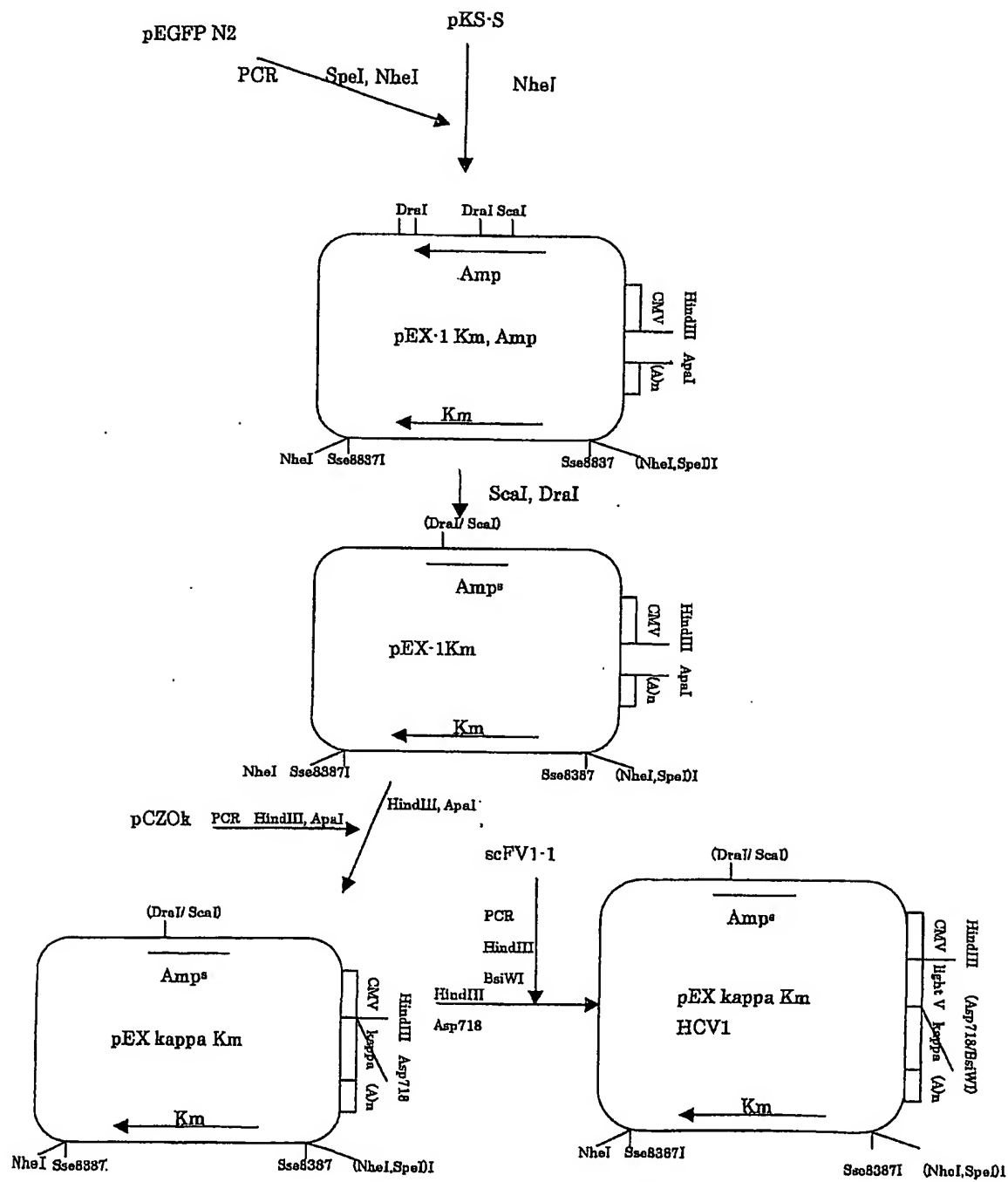
第 6 図



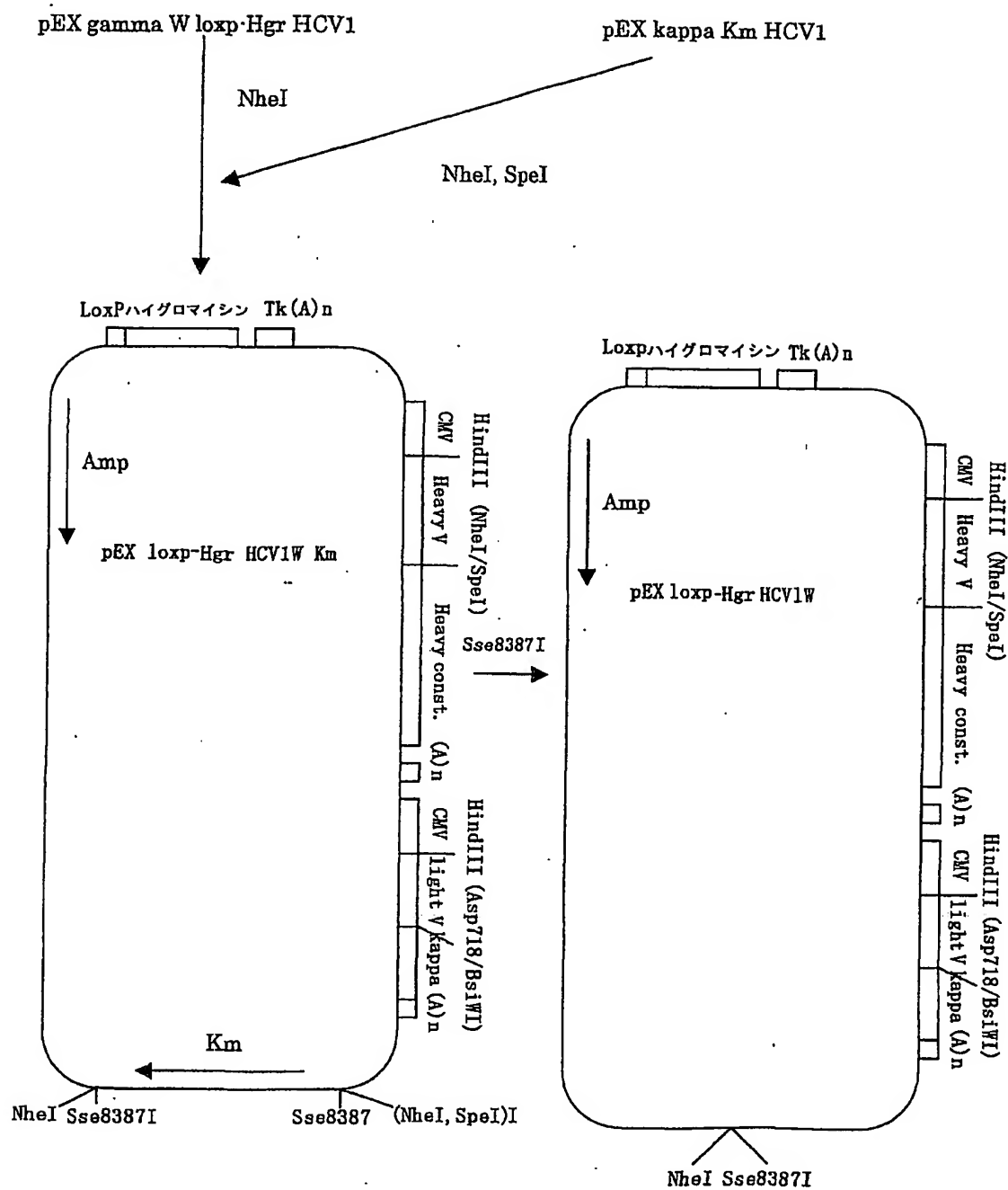
第 7 図



第 8 図



第 9 図



SEQUENCE LISTING

<110> Mitsubishi-Tokyo Pharmaceutical, Co.

<120> A therapeutic agent for hepatitis type C

<130> A11037MA

<160> 81

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Gln Pro Ile Gly

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp

1 5 10 15

Pro

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Thr Ser Arg Leu Tyr Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Gln Thr Lys Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Leu Gln His Asp Ser Tyr Pro Phe Ser

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Ala Ser Arg Leu Gln Arg

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Asn Pro Thr

1 5

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His

1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Phe Glu

1 5 10

<210> 16

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro

1 5 10 15

Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Tyr Ile

20 25 30

Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro His Tyr Ala Gln

50 55 60

Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg Gly Ser Cys Tyr

100 105 110

Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 17

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu
35 40 45
Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys Ser Phe Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
100 105 110

<210> 18

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Ser Tyr Pro Phe
 85 90 95
 Ser Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
 100 105 110

<210> 19

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Phe
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Met Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Arg Gly Asp Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ser Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Asn Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala

100 105 110
 <210> 20
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Pro Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Phe Glu Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ala Ala Ala

115
 <210> 21
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

```

atg gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct   48
Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro
      1              5              10              15
ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc tac atc   96
Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Tyr Ile
              20              25              30
gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag   144
Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu
              35              40              45
tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca cac tac gca cag   192
Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro His Tyr Ala Gln
              50              55              60
aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag tcc acg agc aca   240
Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr
      65              70              75              80
gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac acg gcc gta tat   288
Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
              85              90              95
tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt ggt tcc tgc tat   336
Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg Gly Ser Cys Tyr
              100             105             110
gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcg agt   384
Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
              115             120             125

```

<210> 22

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cag gcg agt cag gac att agc aac tat 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg ctc 144

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu

35 40 45

tat gct aca tcc aga ttg tac agt ggg gtc cca tcc agg ttc agt ggc 192

Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc agc atc agc agc ctg cag cct 240

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag act aag agt ttc ccc ctc 288

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys Ser Phe Pro Leu

85 90 95

act ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt gcg gcc gca 333

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala

100 105 110

<210> 23

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc gtg tct gct tct gta ggg	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag gat att agc acc tgg	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Thr Trp	
20 25 30	
tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aga gcc cct aag ctc ctg atc	144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc	192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc agc agc ctg cag cct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gaa gat ttt gca act tat tac tgt cta cag cat gat agt tac ccc ttc	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asp Ser Tyr Pro Phe	
85 90 95	
tct ttc ggc cct ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt gcg gcc gca	333
Ser Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala	
100 105 110	

<210> 24

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 24

gac atc gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aca gtc acc atc tct tgc cgg gca agt cag agc att tcc aac ttt 96
 Asp Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Phe
 20 25 30
 tta aac tgg tat cgg cag aaa cca gga aag gcc cct gaa ctg atg att 144
 Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Met Ile
 35 40 45
 tat gct gcg tcc aga ctg caa cgt ggg gac cca tca agg ttt agt ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Arg Gly Asp Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gaa ttc agt ctc acc atc agc ggt ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gag gat tct gca acc tat cac tgt caa cag agt tac agt acc aat ccc 288
 Glu Asp Ser Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Asn Pro
 85 90 95
 acg ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt gcg gcc gca 333
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
 100 105 110

<210> 25

<211> 348

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 25

cag gct gtg ctc act cag ccg tcc tca gtg tct ggg ccc cca ggg cag 48

Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Pro Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 agg gtc acc atc tcc tgc act ggg agc agc tcc aac atc ggg gca ggt 96
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 tat gat gta cac tgg tac cag cag ctt cca gga aca gcc ccc aaa ctc 144
 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 ctc atc tat ggt aac aac aat cgg ccc tca ggg gtc cct gac cga ttc 192
 Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg gcc atc act ggg ctc 240
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 cag gct gag gat gag gct gat tat tac tgc cag tcc tat gac agc agc 288
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 ctg agt ggg ttt gag gtc ttc gga acc ggg acc aag gtg gag atc aaa 336
 Leu Ser Gly Phe Glu Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 cgt gcg gcc gca 348
 Arg Ala Ala Ala
 115

<210> 26

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

```

gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg      48
Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala
   1             5             10             15
gcc cag ccg gcc atg gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag      96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
           20             25             30
gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga     144
Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
           35             40             45
ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga     192
Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
           50             55             60
caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca     240
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro
           65             70             75             80
cac tac gca cag aag ttc cag gcc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag     288
His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu
           85             90             95
tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac     336
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp
           100            105            110
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt     384
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg
           115            120            125
ggg tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc     432
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

```


130	135	140	
acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt	480		
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
145	150	155	160
ggc gga agt gca ctt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg	528		
Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu			
165	170	175	
tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cag gcg agt cag	576		
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln			
180	185	190	
gac att agc aac tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc	624		
Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala			
195	200	205	
cct aag ctc ctg ctc tat gct aca tcc aga ttg tac agt ggg gtc cca	672		
Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Tyr Ser Gly Val Pro			
210	215	220	
tcc agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc agc atc	720		
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile			
225	230	235	240
agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag act	768		
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr			
245	250	255	
aag agt ttc ccc ctc act ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa	816		
Lys Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
260	265	270	
cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg	864		
Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser			

275	280	285	
agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag			900
Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala			
290	295		
<210> 27			
<211> 900			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 27			
gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg			48
Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala			
1	5	10	15
gcc cag ccg gcc atg gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag			96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu			
20	25	30	
gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga			144
Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly			
35	40	45	
ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga			192
Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly			
50	55	60	
caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca			240
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro			
65	70	75	80
cac tac gca cag aag ttc cag gcc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag			288
His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu			
85	90	95	

tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac	336
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp	
100 105 110	
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt	384
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg	
115 120 125	
ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc	432
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
130 135 140	
acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt	480
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
145 150 155 160	
ggc gga agt gca ctt gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc gtg	528
Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val	
165 170 175	
tct gct tct gta ggg gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag	576
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln	
180 185 190	
gat att agc acc tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aga gcc	624
Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala	
195 200 205	
cct aag ctc ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca	672
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro	
210 215 220	
tca agg ttc agc ggc agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc	720
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile	
225 230 235 240	

agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cta cag cat 768
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His
 245 250 255
 gat agt tac ccc ttc tct ttc ggc cct ggg acc aag gtg gaa atc aaa 816
 Asp Ser Tyr Pro Phe Ser Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 260 265 270
 cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg 864
 Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser
 275 280 285
 agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag 900
 Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala
 290 295
 <210> 28
 <211> 900
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 28
 gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg 48
 Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala
 1 5 10 15
 gcc cag ccg gcc atg gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag 96
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu
 20 25 30
 gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga 144
 Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45
 ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga 192

Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly	
50 55 60	
caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca	240
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro	
65 70 75 80	
cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag	288
His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu	
85 90 95	
tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac	336
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp	
100 105 110	
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt	384
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg	
115 120 125	
ggg tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc	432
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
130 135 140	
acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt	480
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
145 150 155 160	
ggc gga agt gca ctt gac atc gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg	528
Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
165 170 175	
tct gca tct gta gga gac aca gtc acc atc tct tgc cgg gca agt cag	576
Ser Ala Ser Val Gly Asp Thr Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln	
180 185 190	
agc att tcc aac ttt tta aac tgg tat cgg cag aaa cca gga aag gcc	624

Ser Ile Ser Asn Phe Leu Asn Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 195 200 205
 cct gaa ctg atg att tat gct gcg tcc aga ctg caa cgt ggg gac cca 672
 Pro Glu Leu Met Ile Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Arg Gly Asp Pro
 210 215 220
 tca agg ttt agt ggc agt gga tct ggg aca gaa ttc agt ctc acc atc 720
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ser Leu Thr Ile
 225 230 235 240
 agc ggt ctg cag cct gag gat tct gca acc tat cac tgt caa cag agt 768
 Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser
 245 250 255
 tac agt acc aat ccc acg ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gag atc aaa 816
 Tyr Ser Thr Asn Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 260 265 270
 cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg 864
 Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser
 275 280 285
 agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag 900
 Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala
 290 295
 <210> 29
 <211> 915
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg 48
 Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala

1	5	10	15	
gcc cag ccg gcc atg gcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag	96			
Ala Gln Pro Ala Met Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu				
20	25	30		
gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga	144			
Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly				
35	40	45		
ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga	192			
Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly				
50	55	60		
caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca	240			
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro				
65	70	75	80	
cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag	288			
His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu				
85	90	95		
tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac	336			
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp				
100	105	110		
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt	384			
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg				
115	120	125		
ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc	432			
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val				
130	135	140		
acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt	480			
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly				

145	150	155	160	
ggc gga agt gca ctt cag gct gtg etc act cag ccg tcc tca gtg tct	528			
Gly Gly Ser Ala Leu Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser				
165	170	175		
ggg ccc cca ggg cag agg gtc acc atc tcc tgc act ggg agc agc tcc	576			
Gly Pro Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser				
180	185	190		
aac atc ggg gca ggt tat gat gta cac tgg tac cag cag ctt cca gga	624			
Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly				
195	200	205		
aca gcc ccc aaa ctc ctc atc tat ggt aac aac aat cgg ccc tca ggg	672			
Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly				
210	215	220		
gtc cct gac cga ttc tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg	720			
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu				
225	230	235	240	
gcc atc act ggg ctc cag gct gag gat gag gct gat tat tac tgc cag	768			
Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln				
245	250	255		
tcc tat gac agc agc ctg agt ggg ttt gag gtc ttc gga acc ggg acc	816			
Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Phe Glu Val Phe Gly Thr Gly Thr				
260	265	270		
aag gtg gag atc aaa cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa	864			
Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu				
275	280	285		
gag gat ctg ggc tcg agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca	912			
Glu Asp Leu Gly Ser Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala				

290 295 300

tag 915

<210> 30

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 30

cccaagctta ccatggatgc aatgaagaga gggctctgct gtgtgctgct gctgtgtgga 60

gcagtcttcg ttctggctag ccataccgc gtgacggggg gggtgcaagg 110

<210> 31

<211> 82

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 31

ccccctcgag tctagattaa cgcggttcca gggatccgg atacggcacc ggcgcaccgg 60

agacgaccgc cgaccctata cc 82

<210> 32

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 32

gcgccgcat gggagtggag ggctgc

36

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 33

ctcagtacac ggagctgttc cgga

24

<210> 34

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro

1 5 10 15

Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Tyr Ile

20 25 30

Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro His Tyr Ala Gln

50 55 60

Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr

65 70 75 80

Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg Gly Ser Cys Tyr

100	105	110	
Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115	120	125	
<210> 35			
<211> 380			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 35			
atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag gtg aag aag cct	48		
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro			
1 5 10 15			
ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc tac atc	96		
Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Tyr Ile			
20 25 30			
gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag	144		
Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu			
35 40 45			
tgg atg gga ggc atc atc cct ctc tct ggt ccg cca cac tac gca cag	192		
Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro His Tyr Ala Gln			
50 55 60			
aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag tcc acg agc aca	240		
Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr			
65 70 75 80			
gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac acg gcc gta tat	288		
Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
85 90 95			
tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt ggt tcc tgc tat	336		

Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg Gly Ser Cys Tyr

100

105

110

gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcg agt 384

Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

125

<210> 36

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg 48

Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala

1

5

10

15

gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag 96

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu

20

25

30

gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga 144

Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga 192

Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

50

55

60

caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca 240

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro

65

70

75

80

cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag 288

His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu

85	90	95	
tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac			336
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp			
100	105	110	
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt			384
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg			
115	120	125	
ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc			432
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
130	135	140	
acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt			480
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
145	150	155	160
ggc gga agt gca ctt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg			528
Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu			
165	170	175	
tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cag gcg agt cag			576
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln			
180	185	190	
gac att agc aac tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc			624
Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala			
195	200	205	
cct aag ctc ctg ctc tat gct aca tcc aga ttg tac agt ggg gtc cca			672
Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Tyr Ser Gly Val Pro			
210	215	220	
tcc agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc agc atc			720
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile			

225 230 235 240
 agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag act 768
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr
 245 250 255
 aag agt ttc ccc ctc act ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa 816
 Lys Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 260 265 270
 cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg 864
 Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser
 275 280 285
 agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag 900
 Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala

290

295

<210> 37

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg 48
 Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala
 1 5 10 15
 gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag 96
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu
 20 25 30
 gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga 144
 Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45

ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga	192
Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly	
50 55 60	
caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca	240
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro	
65 70 75 80	
cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag	288
His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu	
85 90 95	
tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac	336
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp	
100 105 110	
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt	384
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg	
115 120 125	
ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc	432
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
130 135 140	
acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt	480
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
145 150 155 160	
ggc gga agt gca ctt gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc gtg	528
Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val	
165 170 175	
tct gct tct gta ggg gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag	576
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln	
180 185 190	

gat att agc acc tgg tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aga gcc 624
 Asp Ile Ser Thr Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala
 195 200 205
 cct aag ctc ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca 672
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro
 210 215 220
 tca agg ttc agc ggc agt ggg tct ggg aca gaa ttc act ctc aca atc 720
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile
 225 230 235 240
 agc agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cta cag cat 768
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His
 245 250 255
 gat agt tac ccc ttc tct ttc ggc cct ggg acc aag gtg gaa atc aaa 816
 Asp Ser Tyr Pro Phe Ser Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 260 265 270
 cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg 864
 Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser
 275 280 285
 agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag 900
 Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala
 290 295
 <210> 38
 <211> 900
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg 48

Val	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Ala	Ile	Pro	Leu	Val	Val	Pro	Phe	Tyr	Ala	
1				5					10					15		
gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag																96
Ala	Gln	Pro	Ala	Met	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	
			20					25					30			
gtg aag aag cct ggg tcc tcc gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga																144
Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	
			35				40				45					
ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga																192
Gly	Thr	Tyr	Ile	Asp	Gln	Pro	Ile	Gly	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	
			50				55				60					
caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca																240
Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Gly	Ile	Ile	Pro	Leu	Ser	Gly	Pro	Pro	
			65				70				75			80		
cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcc att acc gcg gac gag																288
His	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Val	Ser	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	
				85				90				95				
tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac																336
Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Glu	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	
			100					105				110				
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt																384
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Val	Leu	Arg	Gly	Tyr	Cys	Arg	Arg	
			115				120				125					
ggc tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc																432
Gly	Ser	Cys	Tyr	Asp	Trp	Leu	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	
			130				135				140					
acc gtc tcc agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt																480

$$32 \div 64$$

Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala

290

295

<210> 39

<211> 915

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg 48

Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala

1

5

10

15

gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag 96

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu

20

25

30

gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga 144

Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly

35

40

45

ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga 192

Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

50

55

60

caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca 240

Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro

65

70

75

80

cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag 288

His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu

85

90

95

tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac 336

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp

100	105	110	
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt	384		
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg			
115	120	125	
ggg tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc	432		
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
130	135	140	
acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt	480		
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
145	150	155	160
ggc gga agt gca ctt cag gct gtg ctc act cag ccg tcc tca gtg tct	528		
Gly Gly Ser Ala Leu Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser			
165	170	175	
ggg ccc cca ggg cag agg gtc acc atc tcc tgc act ggg agc agc tcc	576		
Gly Pro Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser			
180	185	190	
aac atc ggg gca ggt tat gat gta cac tgg tac cag cag ctt cca gga	624		
Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly			
195	200	205	
aca gcc ccc aaa ctc ctc atc tat ggt aac aac aat cgg ccc tca ggg	672		
Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly			
210	215	220	
gtc cct gac cga ttc tct ggc tcc aag tct ggc acc tca gcc tcc ctg	720		
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu			
225	230	235	240
gcc atc act ggg ctc cag gct gag gat gag gct gat tat tac tgc cag	768		
Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln			

245	250	255	
tcc tat gac agc agc ctg agt ggg ttt gag gtc ttc gga acc ggg acc			816
Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Phe Glu Val Phe Gly Thr Gly Thr			
260	265	270	
aag gtg gag atc aaa cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa			864
Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu			
275	280	285	
gag gat ctg ggc tcg agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca			912
Glu Asp Leu Gly Ser Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala			
290	295	300	
tag			915
<210> 40			
<211> 1428			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 40			
atg aaa cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gca gct ccc aga tgg			48
Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp			
1	5	10	15
gtc ctg tcc cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag			96
Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys			
20	25	30	
cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc tac			144
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Tyr			
35	40	45	
atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt			192
Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu			

50	55	60	
gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca cac tac gca			240
Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro His Tyr Ala			
65	70	75	80
cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag tcc acg agc			288
Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser			
	85	90	95
aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac acg gcc gta			336
Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val			
	100	105	110
tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt ggt tcc tgc			384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg Gly Ser Cys			
	115	120	125
tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcg			432
Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser			
	130	135	140
agt gct agt acc aag ggc cca tcc gtc ttc ccc ctg gca ccc tcc tcc			480
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser			
	145	150	155
aag agc acc tct ggg ggc aca gcg gcc ctg ggc tgc ctg gtc aag gac			528
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp			
	165	170	175
tac ttc cct gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc			576
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr			
	180	185	190
agc ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac			624
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr			

195	200	205	
tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag	672		
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln			
210	215	220	
acc tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac	720		
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp			
225	230	235	240
aag aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg	768		
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro			
245	250	255	
tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc	816		
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro			
260	265	270	
cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca	864		
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
275	280	285	
tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac	912		
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn			
290	295	300	
tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg	960		
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
305	310	315	320
gag gag cag tac aac agc acg tac cgg gtg gtc agc gtc ctc acc gtc	1008		
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			
325	330	335	
ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc	1056		
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser			

340	345	350	
aac aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa			1104
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
355	360	365	
ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat			1152
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp			
370	375	380	
gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc			1200
Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
385	390	395	400
tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag			1248
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
405	410	415	
aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc			1296
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
420	425	430	
ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg			1344
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly			
435	440	445	
aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac			1392
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr			
450	455	460	
acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa tga			1428
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Stop			
465	470	475	
<210> 41			
<211> 720			

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

atg gcg ttg cag acc cag gtc ttc att tct ctg ttg ctc tgg atc tct	48
Met Ala Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
1 5 10 15	
ggt gcc tac ggg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct	96
Gly Ala Tyr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser	
20 25 30	
gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cag gcg agt cag gac	144
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp	
35 40 45	
att agc aac tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct	192
Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro	
50 55 60	
aag ctc ctg ctc tat gct aca tcc aga ttg tac agt ggg gtc cca tcc	240
Lys Leu Leu Leu Tyr Ala Thr Ser Arg Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser	
65 70 75 80	
agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc agc atc agc	288
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser	
85 90 95	
agc ctg cag cct gaa gat ttt gca act tac tat tgt caa cag act aag	336
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Lys	
100 105 110	
agt ttc ccc ctc act ttc ggc ggg ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt	384
Ser Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg	
115 120 125	

acc gtg gaa atc aaa cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc 432
 Thr Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe

130

135

140

ccg cca tct gat gag cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc 480
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys

145

150

155

160

ctg ctg aat aac ttc tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg 528
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val

165

170

175

gat aac gcc ctc caa tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag 576
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln

180

185

190

gac agc aag gac agc acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc 624
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser

195

200

205

aaa gca gac tac gag aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat 672
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His

210

215

220

cag ggc ctg agc tcg ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt 720
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230

235

240

<210> 42

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Arg Ala Asn Gln Asn Ile Gly Asn Phe Leu Asn

1 5 10

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Gln Gln Ser His Asn Ile Pro Leu Thr

1 5

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gln Gln Ser Tyr Asp Ser Thr Leu Phe Thr

1 5 10

<210> 48

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gln Gln Ser Tyr Thr Ile Pro Tyr Thr

1 5

<210> 54

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Gln Asn Ile Gly Asn Phe
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Asn Ile Pro Leu
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
100 105 110

<210> 55

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Ser Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asp Ser Thr Leu

85

90

95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala

100

105

110

<210> 56

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20

25

30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala

100

105

110

<210> 57

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Ile Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala

100 105 110

<210> 58

<211> 333

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

gat gtt gtg atg act cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta ggg 48

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca aat cag aac att ggt aat ttt	96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Gln Asn Ile Gly Asn Phe	
20 25 30	
tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ccc ctg atc	144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile	
35 40 45	
tat gct gca tcc aat ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc	192
Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
50 55 60	
agt gga tct ggg aca gat ttc agt ctc acc atc agc agt ctg caa cct	240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
65 70 75 80	
gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag agt cac aat atc ccg ctc	288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Asn Ile Pro Leu	
85 90 95	
act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt gcg gcc gca	333
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala	
100 105 110	

<210> 59

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc ctg tct gca tct gta gga	48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
gac aga gtc acc atg act tgc cgg gca agt cag agt att aac aac tat	96

Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asn Asn Tyr
 20 25 30
 tta aat tgg tat caa caa aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctg atc 144
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tct gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tcg agg ttc agt ggc 192
 Ser Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc acc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gag gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac gat tcc acc cta 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asp Ser Thr Leu
 85 90 95
 ttc act ttc ggc cct ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt gcg gcc gca 336
 Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
 100 105 110
 <210> 60
 <211> 333
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 60
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20	25	30	
tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc			144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc			192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct			240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac agt acc ccg ctc			288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu			
85	90	95	
act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa cgt gcg gcc gca			333
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala			
100	105	110	
<210> 61			
<211> 333			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 61			
gac atc gtg atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga			48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag cgc att agc aac tat			96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Arg Ile Ser Asn Tyr			
20	25	30	

tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg gtc 144
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val

35

40

45

tat gct gca tct aat ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50

55

60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65

70

75

80

gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt tac act att ccg tac 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Ile Pro Tyr

85

90

95

act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa cgt gcg gcc gca 333
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala

100

105

110

<210> 62

<211> 900

<212> DNA

<213> Homo sapiens .

<400> 62

gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg 48
 Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala

1

5

10

15

gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag 96
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu

20

25

30

gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga 144

Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly	
35 40 45	
ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga	192
Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly	
50 55 60	
caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca	240
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro	
65 70 75 80	
cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag	288
His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu	
85 90 95	
tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac	336
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp	
100 105 110	
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt	384
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg	
115 120 125	
ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc	432
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
130 135 140	
acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt	480
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
145 150 155 160	
ggc gga agt gca ctt gat gtt gtg atg act cag tct cca tcc tcc ctg	528
Gly Gly Ser Ala Leu Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
165 170 175	
tct gca tct gta ggg gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca aat cag	576

Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Asn Gln
 180 185 190
 aac att ggt aat ttt tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc 624
 Asn Ile Gly Asn Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 195 200 205
 cct aag ccc ctg atc tat gct gca tcc aat ttg caa agt ggg gtc cca 672
 Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro
 210 215 220
 tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc agt ctc acc atc 720
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile
 225 230 235 240
 agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt caa cag agt 768
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
 245 250 255
 cac aat atc ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 816
 His Asn Ile Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 260 265 270
 cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg 864
 Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser
 275 280 285
 agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag 900
 Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala Stop
 290 295 300

<210> 63

<211> 903

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg	48
Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala	
1 5 10 15	
gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag	96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu	
20 25 30	
gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga	144
Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly	
35 40 45	
ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga	192
Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly	
50 55 60	
caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca	240
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro	
65 70 75 80	
cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag	288
His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu	
85 90 95	
tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac	336
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp	
100 105 110	
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt	384
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg	
115 120 125	
ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc	432
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	

130	135	140	
acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt	480		
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly			
145	150	155	160
ggc gga agt gca ctt gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc ctg	528		
Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu			
165	170	175	
tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atg act tgc cgg gca agt cag	576		
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Gln			
180	185	190	
agt att aac aac tat tta aat tgg tat caa caa aaa cca ggg aaa gcc	624		
Ser Ile Asn Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala			
195	200	205	
cct aag ctc ctg atc tct gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca	672		
Pro Lys Leu Leu Ile Ser Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro			
210	215	220	
tcg agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc	720		
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile			
225	230	235	240
acc agt ctg caa cct gag gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt	768		
Thr Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser			
245	250	255	
tac gat tcc acc cta ttc act ttc ggc cct ggg acc aag gtg gaa atc	816		
Tyr Asp Ser Thr Leu Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile			
260	265	270	
aaa cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc	864		
Lys Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly			

275	280	285	
tcg agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag			903
Ser Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala Stop			
290	295	300	
<210> 64			
<211> 900			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<400> 64			
gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg			48
Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala			
1 5 10 15			
gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag			96
Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu			
20 25 30			
gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga			144
Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly			
35 40 45			
ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga			192
Gly Thr Tyr Ile Asp Gln Pro Ile Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly			
50 55 60			
caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ctc tct ggt ccg cca			240
Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Leu Ser Gly Pro Pro			
65 70 75 80			
cac tac gca cag aag ttc cag ggc aaa gtc tcg att acc gcg gac gag			288
His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Lys Val Ser Ile Thr Ala Asp Glu			
85 90 95			

tcc acg agc aca gct tac ctg gaa ctg acc agc ctc aca tct gag gac	336
Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp	
100 105 110	
acg gcc gta tat tac tgt gcg agg gtc ctt agg ggt tat tgt cgt cgt	384
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Arg Gly Tyr Cys Arg Arg	
115 120 125	
ggt tcc tgc tat gac tgg ctc gac ccc tgg ggc cag ggc acc ctg gtc	432
Gly Ser Cys Tyr Asp Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
130 135 140	
acc gtc tcg agt gga ggc ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt	480
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
145 150 155 160	
ggc gga agt gca ctt gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg	528
Gly Gly Ser Ala Leu Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu	
165 170 175	
tct gca tct gta gga gac aga gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag	576
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln	
180 185 190	
agc att agc agc tat tta aat tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc	624
Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala	
195 200 205	
cct aag ctc ctg atc tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca	672
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro	
210 215 220	
tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc	720
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	
225 230 235 240	

agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt 768
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
 245 250 255
 tac agt acc ccg ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 816
 Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 260 265 270
 cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg 864
 Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser
 275 280 285
 agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag 900
 Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala Stop
 290 295 300
 <210> 65
 <211> 900
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 65
 gtg aaa aaa tta tta ttc gca att cct tta gtt gtt cct ttc tat gcg 48
 Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ala
 1 5 10 15
 gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gct gag 96
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu
 20 25 30
 gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga 144
 Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly
 35 40 45
 ggc acc tac atc gac caa cct atc ggc tgg gtg cga cag gcc cct gga 192

Arg Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 195 200 205
 cct aag ctc ctg gtc tat gct gca tct aat ttg caa agt ggg gtc cca 672
 Pro Lys Leu Leu Val Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro
 210 215 220
 tca agg ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc 720
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 225 230 235 240
 agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gca act tac tac tgt caa cag agt 768
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser
 245 250 255
 tac act att ccg tac act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 816
 Tyr Thr Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 260 265 270
 cgt gcg gcc gca gag cag aag ctg atc agc gaa gag gat ctg ggc tcg 864
 Arg Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ser
 275 280 285
 agg tcg acc cac cat gcg cat cac cac gcc gca tag 900
 Arg Ser Thr His His Ala His His His Ala Ala Stop
 290 295 300

<210> 66

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 66

ccctgatcag aattgcagg atccctcgag actagtgatg atcgggccag atatacgcg 59

<210> 67

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 67

ccctgatcaa gatctgctag cgtcgactcc ccagcatgcc tgctgctatt g 51

<210> 68

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 68

ccccagatct ctattccttt gccctcggac gag 33

<210> 69

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 69

ccccaagctt atgaaaaagc ctgaactcac cgcg 34

<210> 70

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 70

cccgccggct ggggtgtggcg gaccgc

26

<210> 71

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 71

cccctctaga aagtatagga acttcaagc

29

<210> 72

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 72

ccccaagctt ctcgagacta gtaccaaggg cccatcggtc ttccc

45

<210> 73

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 73

ccccgggccc tctagtagct ttcatttacc cggagacagg g 41

<210> 74

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 74

cccaagcttc accatgaaac acctgtggtt cttcctcctg ctggtggcag ctcccagatg 60
ggctctgtcc caggtgcagc tgggtgcagtc tg

<210> 75

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 75

cccgctagca ctcgagacgg tgaccagggt gcc 33

<210> 76

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 76

ccccagagct agtcctgcag gcggggaaat gtgcgcggaa cccct

45

<210> 77

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 77

ccccgctagc ctgcaagtca ttctgaaccc cagcgtccc

39

<210> 78

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 78

ccccaagctt ctagagtcga cggtaccgtg gaaatcaaac gaactgtgg

49

<210> 79

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 79

ccccgggccc tctagcggcc gcctaacact ctcccctgtt gaagc

45

<210> 80

<211> 96

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 80

cccaagcttc accatggcgt tgcagaccca ggtcttcatt tctctgttgc tctggatctc 60
tggtgcctac ggggacatcc agatgaccca gtctcc

<210> 81

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 81

ccccgtacgt ttgatttcca ccttggtccc cccg

34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00967

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K 31/737, 38/17, 39/395, A61K 45/00, A61P 31/20, C07K 16/10, C12N 15/09, G01N 33/50, 33/53, 33/576

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K 31/737, 38/17, 39/395, A61K 45/00, A61P 31/20, C07K 16/10, C12N 15/09, G01N 33/50, 33/53, 33/576

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	PILERI P., et al., "Binding of hepatitis C virus to CD81", Science (1998) vol.282, pp.938-941	1, 3-8/9-74
Y	WO, 99/18198, A1 (CHIRON S.P.A.), 15 April, 1999 (15.04.99) & AU, 9893633, A & EP, 1021534, A1	9-74
Y	Hide KIKUCHI, "Ketsueki Baikai Kansensho HCV", Rinshou to Kenkyu (1999) Vol.76, No.7, pp.1260-1266	9-74
PX	Tobias Allander, et al., "Recombinant human monoclonal antibodies against different conformational epitopes of the E2 envelope glycoprotein of hepatitis C virus that inhibit its interaction with CD81", Journal of General Virology (October 2000) Vol.81, No.10, pp.2451-2459	1, 3-74
A	Mike Flint, et al., "Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein", Journal of Virology (1999) Vol.73, No.8, pp.6782-6790	1-74

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 07 May, 2001 (07.05.01)

Date of mailing of the international search report
 15 May, 2001 (15.05.01)

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/00967

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Mike Flint, et al., "Functional characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein", Journal of Virology (January 2000) Vol.74, No.2, pp.702-709	1-74

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K 31/737, 38/17, 39/395, A61K 45/00, A61P 31/20, C07K 16/10,
C12N 15/09, G01N 33/50, 33/53, 33/576

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K 31/737, 38/17, 39/395, A61K 45/00, A61P 31/20, C07K 16/10,
C12N 15/09, G01N 33/50, 33/53, 33/576

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG),
BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	PILERI P., et al. "Binding of hepatitis C virus to CD81", Science (1998) vol. 282, p. 938-941	1, 3-8/9-74
Y	WO, 99/18198, A1 (CHIRON S. P. A.) 15. 4月. 1999 (15. 04. 99) &AU, 9893633, A &EP, 1021534, A1	9-74
Y	菊池秀, "血液媒介感染症 HCV", 臨床と研究 (1999) vol. 76, no. 7, p. 1260-1266	9-74

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 05. 01

国際調査報告の発送日

15.05.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4 B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	Tobias Allander, et al. "Recombinant human monoclonal antibodies against different conformational epitopes of the E2 envelope glycoprotein of hepatitis C virus that inhibit its interaction with CD81", Journal of General Virology (Oct. 2000) vol. 81, no. 10, p. 2451-2459	1, 3-74
A	Mike Flint, et al. "Functional analysis of cell surface-expressed hepatitis C virus E2 glycoprotein", Journal of Virology (1999) vol. 73, no. 8, p. 6782-6790	1-74
A	Mike Flint, et al. "Functional characterization of intracellular and secreted forms of a truncated hepatitis C virus E2 glycoprotein", Journal of Virology (Jan. 2000) vol. 74, no. 2, p. 702-709	1-74

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.